

NOUVEAUX TENSIO-ACTIFS ET LEURS APPLICATIONS

La présente invention a pour objet de nouveaux tensioactifs de type télomère, leur utilisation pour la préparation de systèmes supramoléculaires métastables. Ces systèmes supramoléculaires métastables ou nano particules peuvent être des liposomes, ou des systèmes micellaires. L'invention a également pour objet les liposomes et les nanoparticules atypiques obtenus à partir de ces tensio-actifs et leur utilisation comme vecteurs de principes actifs, notamment de principes actifs thérapeutiques.

Certaines molécules amphiphiles, les phospholipides naturels, ont la propriété de s'associer dans l'eau en formant des organisations supramoléculaires métastables de formes sphériques appelées liposomes qui renferment un compartiment aqueux interne. Ces liposomes sont capables de renfermer des actifs thérapeutiques au sein de ce compartiment interne et peuvent ainsi servir à véhiculer ces actifs vers des cellules ou des tissus cibles. L'étude de ces vecteurs particulaires a fait l'objet d'une littérature abondante dans laquelle les problèmes ainsi que les potentialités de leur utilisation ont été largement abordés (Barenholz, Curr. Opin. In Coll. and Int. Sci. 6 (2001) 66-77).

Toutefois, l'utilisation des liposomes pour le transport de principes actifs thérapeutiques présente quelques inconvénients majeurs :

Ces nanostructures ont généralement une stabilité relativement faible dans le temps, car dans le milieu dans lequel elles sont dispersées, elles fusionnent pour former des objets plus larges qui précipitent ensuite rapidement. Ce comportement limite fortement leur capacité de conservation et de stockage.

La stabilité biologique de ces vecteurs, c'est-à-dire leur temps de rétention dans la circulation sanguine, est étroitement associée à leur taille qui doit être inférieure à 200 nm pour leur permettre d'atteindre une cible potentielle (Nagayasu et al, Adv. Drug Del. Rev. 40 (1999) 75-87). Toutefois, les candidats les plus efficaces de ce point de vue : les liposomes uni lamellaires de petites tailles, présentent l'inconvénient d'être dotés d'un rapport médicament encapsulé / lipides plus faible que les liposomes uni lamellaires de grandes tailles (Vemuri et al., Pharm. Acta Helv. 70 (1995) 95-111). Les lipides formant ces nanostructures présentent généralement un coût de production élevé. La faible capacité d'encapsulation de principes actifs de certains de ces liposomes représente alors un problème économique.

Enfin, il est indispensable de pouvoir disposer d'un vecteur qui puisse libérer son contenu de manière progressive et continue. De telles propriétés nécessitent d'avoir recours à des membranes hautement organisées et imperméables qui sont constituées de formulations de lipides complexes et coûteuses.

Malgré ces difficultés un certain nombre de préparations pharmaceutiques à base de liposomes sont disponibles actuellement sur le marché ou sont en phase clinique. L'avantage le plus appréciable de ces préparations est leur excellente

tolérance par rapport à l'utilisation d'un principe actif libre. Leur efficacité à dose équivalente est cependant à peine supérieure. C'est le cas de l'amphotéricine B encapsulée en liposome (Ambisome®). Son encapsulation dans des formulations lipidiques augmente considérablement son index thérapeutique (Andres et al., Rev. Méd. Interne, 22 (2001) 5 141-150).

Afin de diminuer leur élimination rapide par le système réticuloendothélial, des systèmes de protection des liposomes ont été mis en place. Le plus efficace consiste à utiliser des phospholipides substitués par des polyéthylène glycols de masse moléculaire comprise entre 1000 et 5000 dans une proportion de 5 à 10% du 10 mélange total de phospholipides. Les liposomes « invisibles », dits furtifs, ainsi formés (commercialisés sous le nom de marque Stealth liposomes®) ont des temps de rétention sanguins supérieurs aux liposomes conventionnels (45h contre quelques minutes à quelques heures). L'augmentation du temps de circulation sanguine de ces liposomes favorise leur accumulation dans les tissus cancéreux qui sont particulièrement irrigués, et 15 leur utilisation pour le transport de composés anticancéreux est particulièrement appropriée (Gabizon et al., Cancer Res. 54 (1994) 987-992). Une formulation de Stealth liposomes® à base de dauxorubicine (Doxil®, Alza Corp.) est actuellement commercialisée pour lutter contre le syndrome de Kaposi. Cependant certaines formulations constituées de liposomes de très petites tailles (50 nm) peuvent aussi être considérées comme des préparations à 20 longue circulation. C'est le cas de la formulation anticancéreuse de daunorubicine commercialisée par NeXstar (DaunoXome®).

Afin d'assurer la stabilité mécanique des liposomes que ce soit lors de leur stockage ou de leur utilisation *in vivo*, plusieurs stratégies impliquant l'utilisation de polymères peuvent être envisagées :

La polymérisation des tensioactifs constitutifs de la membrane du liposome après sa formation (Bader et al., Adv. Polym. Sci. 64 (1985) 1-62) et Hotz et al., Adv. Mater. 10 (1998) 1387-1390).

L'interaction de polymères ioniques amphiphiles ou non à la surface de la membrane externe des liposomes (Hayashi et al., Biochim. Biophys. Acta, 1280 (1996) 30 120-126, Ishihara et al., Coll. and Surf., B : Biointerfaces 25 (2002) 325-333).

Enfin, la polymérisation d'un monomère hydrophile à l'intérieur de la cavité aqueuse interne du liposome est une méthode qui a été peu étudiée et qui a été décrite sommairement par Torchilin et al. (Makromol. Chem., Rapid communication, 8 (1987) 457-460). Elle a été utilisée comme outil de fabrication d'empreinte moléculaire 35 polymérisée dans un brevet américain (Perrot et al., US patent n° 6217901, 17 avril 2001).

La limitation essentielle liée à l'utilisation de polymères pour stabiliser les liposomes est la toxicité potentielle induite par leur accumulation dans le lysosome ou par la toxicité propre du monomère hydrophile non polymérisé (cas de l'acrylamide). Afin

de limiter ce phénomène il est crucial d'utiliser des polymères de bas poids moléculaires plus facilement biodégradables.

L'utilisation de micelles stabilisées à partir de composés amphiphiles polymérisés combinant des blocs hydrophiles et hydrophobes pour le transport d'actifs thérapeutiques peu solubles dans l'eau a fait l'objet d'un travail de recherche abondant (G.S. Kwon et al, Adv. Drug Deliver. Rev., 16 (1995) 295-309, M. Jones et al, Eur. J. Pharm. Biopharm., 48 (1999) 101-111, V.P. Torchilin, J. Control. Release, 73 (2001) 137-172). Ces systèmes de vectorisation permettent notamment le transport et la solubilisation d'un certain nombre d'actifs anticancéreux, particulièrement les dérivés polycycliques. Ceux-ci présentent en règle générale une très faible biodisponibilité par voie orale et leur injection par voie intraveineuse entraîne par agrégation des embolies des vaisseaux sanguins ainsi qu'une toxicité locale par dépôt solide (A.N. Lukyanov et al, Adv. Drug Deliver. Rev., (2004) disponible sur internet Science Direct). L'utilisation de liposomes, de microémulsions ou de cyclodextrines sont des solutions prometteuses mais qui présentent encore trop de limitations notamment une variabilité trop importante de la solubilisation de ces actifs peu solubles qui dépend en grande partie de leur structure. La mise au point de systèmes micellaires polymériques de petites tailles représente donc une alternative intéressante à ces technologies à laquelle nous nous sommes intéressés.

Grâce à une CMC particulièrement basse, les tensioactifs polymériques constituant ces micelles leur confèrent une stabilité thermodynamique particulièrement élevée et une capacité de rétention des actifs encapsulés très importante. La taille très faible de ces nanoparticules (inférieure à 100 nm) leur apporte une excellente stabilité *in vivo* ainsi qu'un ciblage passif des sites tumoraux particulièrement irrigués.

Un ciblage actif de ces vecteurs peut-être réalisé par recouvrement de leur surface par des molécules cibles tels que des anticorps, des peptides, des lectines, des sucres, des hormones ou des composés synthétiques spécifiques.

La littérature cite un nombre important de polymères à caractère amphiphile. Ce sont généralement des polymères de type di-block constitués de différents monomères hydrophiles et hydrophobes (M. Jones et al, Eur. J. Pharm. Biopharm., 48 (1999) 101-111, V.P. Torchilin, J. Control. Release, 73 (2001) 137-172). D'autres amphiphiles dérivés de phospholipides et de polymères de polyéthylène glycol et de polyvinyl pyrrolidone ont également été étudiés (A.N. Lukyanov et al, Adv. Drug Deliver. Rev., (2004) disponible sur internet Science Direct).

Un premier objectif de la présente invention est la mise au point de vecteurs nano particulaires à très faible coût de production et ayant la capacité de transporter à l'intérieur de leur cavité aqueuse interne une famille très large d'actifs hydrophiles. Les vecteurs nano particulaires de l'invention permettent l'encapsulation, la rétention et la libération de substances dosables. Les applications visées incluent le

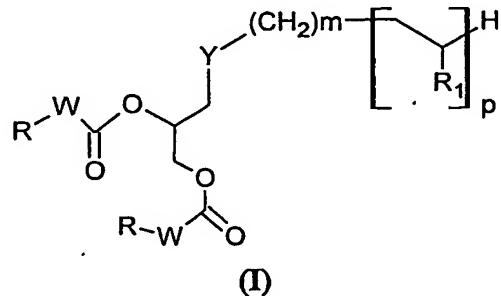
transport de principes actifs, notamment de principes actifs thérapeutiques, la délivrance épidermique de substances cosmétiques, le diagnostic médical. Notamment le transport d'actifs anticancéreux, d'actifs à usage vaccinal, de matériel génétique, d'enzymes, d'hormones, de vitamines, de sucres, de protéines et de peptides, de lipides, de molécules organiques et inorganiques.

Cet objectif a été atteint grâce à la conception et à la synthèse de nouveaux tensioactifs qui permettent de préparer des vecteurs nano particulaires ou liposomes dotés de propriétés avantageuses par rapport aux liposomes de l'art antérieur.

Un second objectif de la présente invention est la mise au point de vecteurs nano particulaires à très faible coût de production et ayant la capacité de transporter à l'intérieur de leur cavité hydrophobe ou de leur feuillet lipidique une famille très large d'actifs hydrophobes. Les vecteurs nano particulaires de l'invention permettent l'encapsulation, la rétention et la libération de substances dosables. Les applications visées incluent le transport de principes actifs, notamment de principes actifs thérapeutiques, la délivrance épidermique de substances cosmétiques, le diagnostic médical. Notamment le transport d'actifs anticancéreux, d'actifs à usage vaccinal, de matériel génétique, d'enzymes, d'hormones, de vitamines, de sucres, de protéines et de peptides, de lipides, de molécules organiques et inorganiques.

Cet objectif a été atteint grâce à la conception et à la synthèse de nouveaux tensioactifs de type télomère qui permettent de préparer des micelles et nanoparticules ellipsoïdales ou liposomes dotées de propriétés avantageuses par rapport aux micelles polymériques de l'art antérieur.

La présente invention a pour objet les composés répondant à la formule
25 (I) :



dans laquelle :

- Y représente un atome de soufre ou un groupement

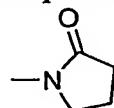
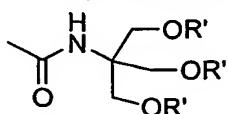
$\begin{array}{c} \text{O} \\ || \\ -\text{NH}-\text{CH}_2-\text{X}- \end{array}$, X étant choisi parmi les groupements S et CH₂, n est un entier allant de 0 à 10, tel que par exemple 0, 1, 2, 3, 4, 5 ou 6 ;

• m est un entier allant de 0 à 9, tel que par exemple 0, 1, 2, 3, 4, 5 ou 6 ; et lorsque X=CH₂ alors 0<m+n<6

• W représente un groupement -NH- ou un groupement -CH₂-

• p représente un entier allant de 1 à 50

• R₁ représente un groupement choisi parmi les radicaux suivants :



dans lesquels R' représente H ou un groupement hydrophile, comme par exemple un composé hydrocarboné polyhydroxylé en C₄-C₂₄ ; notamment R' peut être choisi parmi les sucres comme par exemple le galactose, le glucose, le mannose, l'acide sialique, lié par son carbone anomère ;

• R représente un groupement choisi parmi : les radicaux hydrocarbonés en C₄-C₂₄ ; les radicaux hydrocarbonés fluorés en C₄-C₂₄ ; les radicaux thioalkyls en C₄-C₂₄.

Le groupement R peut notamment être choisi parmi les radicaux suivants :

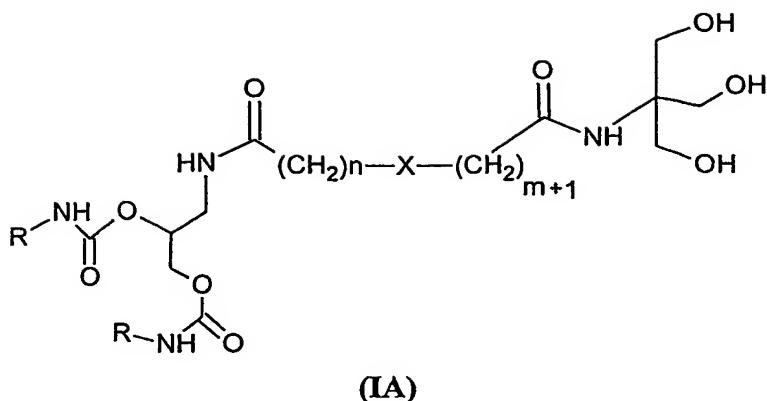
- Le radical thiooctyl

- Les radicaux hydrocarbonés en C₄-C₂₄ tels que le n-butyle, le tert-butyle, l'isobutyle, le n-pentyle, l'isopentyle, le n-hexyle, le n-heptyle, le n-octyle, le n-nonyle, le n-décyle, le n-undécyle, le n-dodécyle, le n-tridécyle, le n-tétradécyle, le n-pentadécyle, le n-hexadécyl, le n-heptadécyle, le n-octadécyle, le radical phytyl (CH₃[CH(CH₃)(CH₂)₃]₃CH(CH₃)CH₂CH₂),

- Les radicaux hydrocarbonés fluorés en C₄-C₂₄ tels que ceux répondant à la formule -(CH₂)_r-(CF₂)_tF, dans laquelle r et t représentent deux entiers avec : 24 ≥ r+t ≥ 4, comme par exemple :

-(CF₂)₄F ; -(CF₂)₅F ; -(CF₂)₆F ; -(CF₂)₇F ; -(CF₂)₈F ; -(CF₂)₉F ; -(CF₂)₁₀F ; -(CF₂)₁₁F ; -(CF₂)₁₂F ; -(CF₂)₁₃F ; -(CF₂)₁₄F ; -CH₂-(CF₂)₃F ; -CH₂-(CF₂)₄F ; -CH₂-(CF₂)₅F ; -CH₂-(CF₂)₆F ; -CH₂-(CF₂)₇F ; -CH₂-(CF₂)₈F ; -CH₂-(CF₂)₉F ; -CH₂-(CF₂)₁₀F ; -CH₂-(CF₂)₁₁F ; -CH₂-(CF₂)₁₂F ; -CH₂-(CF₂)₁₃F ; -(CH₂)₂-(CF₂)₂F ; -(CH₂)₂-(CF₂)₃F ; -(CH₂)₂-(CF₂)₄F ; -(CH₂)₂-(CF₂)₅F ; -(CH₂)₂-(CF₂)₆F ; -(CH₂)₂-(CF₂)₇F ; -(CH₂)₂-(CF₂)₈F ; -(CH₂)₂-(CF₂)₉F ; -(CH₂)₂-(CF₂)₁₀F ; -(CH₂)₂-(CF₂)₁₁F ; -(CH₂)₂-(CF₂)₁₂F ; -(CH₂)₃-(CF₂)₁F ; -(CH₂)₁₃-(CF₂)F ; -(CH₂)₄(CF₂)₆F ; -(CH₂)₄(CF₂)₈F ; (CH₂)₄(CF₂)₁₀F ; -(CH₂)₁₀(CF₂)₆F ; -(CH₂)₁₀(CF₂)₈F ; -(CH₂)₁₀(CF₂)₁₀F....

Selon une première variante préférée, la présente invention a pour objet les composés répondant à la formule (IA) :



dans laquelle :

X représente un atome de soufre S ou un groupement $-CH_2-$;

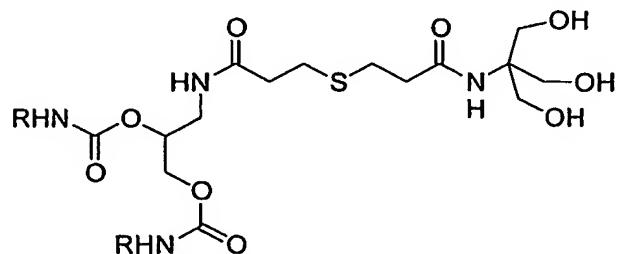
n est un entier allant de 0 à 10, tel que par exemple 0, 1, 2, 3, 4, 5 ou 6 ;
 m est un entier allant de 0 à 9, tel que par exemple 0, 1, 2, 3, 4, 5 ou 6 ;
 lorsque $X=CH_2$ alors $0 < m+n < 6$;

R représente un groupement choisi parmi : les radicaux hydrocarbonés en C_4-C_{24} ; les radicaux hydrocarbonés fluorés en C_4-C_{24} ; les radicaux thioalkyls en C_4-C_{24} .

Les chaînes R préférées sont celles qui contribuent à donner au tensioactif de formule (I) une température de transition de phase supérieure à $37^\circ C$. En effet, lorsque de tels tensioactifs sont utilisés pour la fabrication de liposomes, ces tensioactifs, possédant une structure cristalline à température physiologique, apportent à la membrane des liposomes une rigidité supérieure et un degré de rétention plus important des solutés encapsulés dans le compartiment aqueux interne. De préférence R représente une chaîne hydrocarbonée en $C_{12}-C_{24}$ ou une chaîne hydrocarbonée fluorée en C_8-C_{24} .

Préférentiellement l'une ou plusieurs des conditions suivantes sont vérifiées : $X=S$; $n=2$, $m=1$.

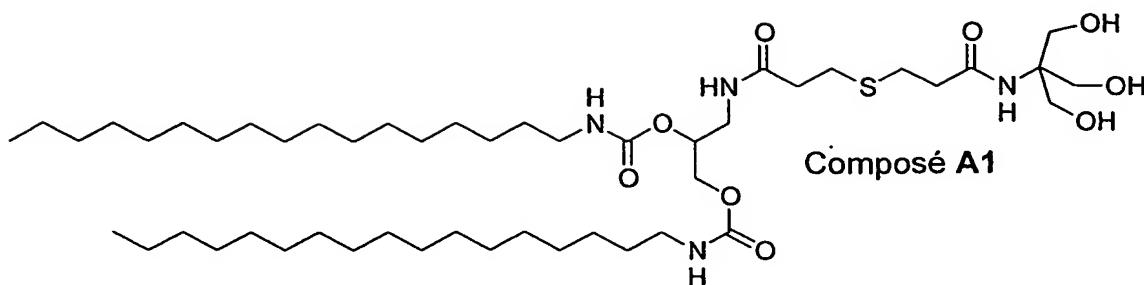
Les composés de formule (IA) préférés sont ceux répondant à la formule A dans laquelle R a la même définition que ci-dessus $n=2$, $X=S$, $m=1$:



Formule A

Parmi ceux-ci, un composé particulièrement préféré est A1 représenté ci-

dessous :



La synthèse des molécules de formule (I) peut être faite de façon simple en utilisant les méthodes classiques de la synthèse organique. Plusieurs exemples de synthèse sont illustrés dans la partie expérimentale.

Un autre objet de l'invention consiste dans l'utilisation des molécules de formule (I), avantageusement des molécules de formule (IA) pour la fabrication de liposomes. Les liposomes de l'art antérieur ont leurs parois généralement constituées de phospholipides.

Les liposomes sont fabriqués à partir des tensioactifs de formule (I), préférentiellement de formule (IA) très facilement par la méthode du film (Liposomes, a practical approach, R.R.C. New, Ed., Oxford University Press, New-York, 1990). Ce procédé peut être résumé de la façon suivante :

Une solution de tensioactif (I) ou (IA) dissous dans du méthanol ou du chloroforme est évaporée lentement dans un ballon afin de former un film fin sur la paroi du ballon. De l'eau distillée à 65°C est additionnée afin de réhydrater le film, à une concentration de 2,5 mg/ml. La solution obtenue est ensuite soumise aux ultrasons pendant 30 minutes dans un bain de sonication à une température supérieure à la température de transition de phase du tensioactif dispersé jusqu'à obtention d'une solution translucide bleutée. On peut également pour cette dernière étape remplacer la sonication par une extrusion répétée de la solution au travers de deux filtres de polycarbonate de porosité 200nm, montés en série. Un double traitement de sonication et d'extrusion peut également être prévu.

D'autres méthodes classiques de préparation de liposomes peuvent être utilisées pour la préparation des liposomes de l'invention. On peut à cet effet se reporter à S. Vemuri et C.T. Rhodes, Pharmaceutica Acta Helvetiae 70, (1995), 95-111.

De façon étonnante on observe la formation de vésicules de forme allongée, désignées vésicules tubulaires en raison de leur taille, qui est de l'ordre de quelques dizaines de nanomètre, et de leur forme qui rappelle celle d'un tube fermé à ses deux extrémités.

La taille et la stabilité mécanique dans le temps des particules obtenues dans la solution ont été mesurées après filtration par diffraction dynamique de la lumière

(High Performance Particle Sizer, Malvern). La nature des particules obtenues a été étudiée par microscopie électronique par transmission après coloration négative de l'échantillon ou après cryofracture (figure 4).

Les mesures de forme et de taille établies par l'observation des clichés de microscopie électronique ont permis de mettre en évidence la formation de liposomes de forme allongée dénommés vésicules tubulaires, refermés à leurs extrémités, dont la section moyenne est comprise entre 20 et 80 nm et la longueur moyenne est comprise entre 200 et 500 nm (figure 3). Les analyses en cryofracture ont confirmé la formation de ces vésicules tubulaires et leurs caractéristiques morphologiques à savoir la présence d'une cavité aqueuse interne isolée du milieu extérieur (figure 5).

Pour un tensioactif de formule (IA) donné la taille des particules est sensiblement homogène : elle varie dans une fourchette de valeur de $\pm 10\%$, préférentiellement de $\pm 5\%$, autour d'une valeur centrale de longueur et de diamètre.

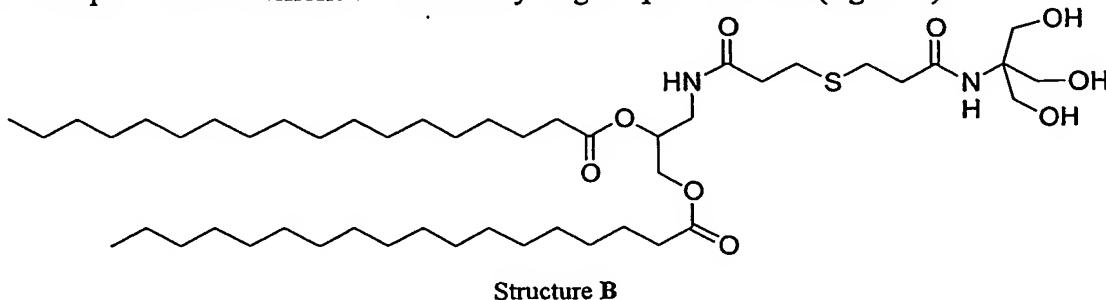
Ces vésicules tubulaires ont une stabilité relativement élevée puisque l'on n'observe aucune évolution de la taille des particules après un an de stockage tandis que des liposomes formés de phosphatidyl choline de jaune d'œuf montrent une évolution après seulement 5 jours de stockage.

La mise en évidence de la cavité interne aqueuse a été prouvée indirectement par des mesures spectrofluorimétriques de l'encapsulation et des cinétiques de relargage d'une sonde fluorescente hydrophile, la carboxyfluorescéine. Les mesures montrent clairement une cinétique de relargage plus lente de la sonde fluorescente comparée à une encapsulation traditionnelle dans un mélange de phosphatidyl choline de jaune d'œuf (figure 1).

Nous avons pu mettre en évidence que les liaisons hydrogène intermoléculaires entre les tensioactifs constituant les vésicules tubulaires étaient à l'origine de leur morphologie et de leur stabilité particulière. En effet, les fonctions alcool du tris(hydroxyméthyl) aminométhane ainsi que les fonctions carbamate ont la propriété de pouvoir générer un réseau de liaisons hydrogène entre les tensioactifs constituant la membrane, stabilisant ainsi les vésicules tubulaires. Ceci a pu être mis en évidence par spectroscopie infra-rouge à transformée de Fourier en phase liquide (dans CCl_4). On note en effet, sur le spectre une augmentation de l'intensité de la bande à 1691 cm^{-1} caractéristique des fonctions carbonyles liées à un atome d'hydrogène, lorsque la concentration en tensioactif dans la solution augmente au détriment de son homologue non lié (figure 2).

Il est à noter que la substitution dans le tensioactif de formule (IA) des liaisons carbamate par des liaisons ester entre les chaînes grasses et le motif glycérol, comme illustré dans la structure B, conduit à la formation dans l'eau de liposomes de structures traditionnelles dont la stabilité mécanique est seulement de quelques heures,

confirmant ainsi l'hypothèse émise de stabilisation et d'organisation des vésicules tubulaires par l'établissement de liaisons hydrogène particulières (figure 6).

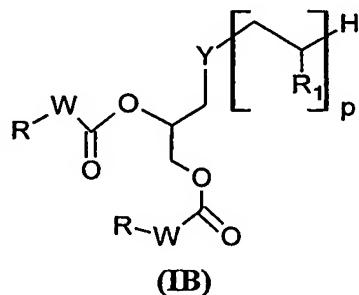


5

L'invention a en outre pour objet des liposomes, ou dispersions aqueuses de vésicules, caractérisés en ce qu'ils comportent un ou plusieurs composés de formule (I), avantageusement de formule (IA) comme constituants de leurs parois.

Ces liposomes présentent des caractéristiques de structure originales qui 10 leur confèrent des propriétés inattendues, en particulier une stabilité améliorée par rapport aux liposomes de l'art antérieur. Les liposomes de l'invention ont également montré une capacité à libérer un principe actif sur une plus longue durée par rapport aux liposomes de l'art antérieur.

Selon une seconde variante préférée, l'invention a pour objet les 15 composés répondant à la formule (IB) :



20

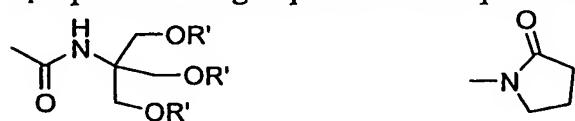
dans laquelle :

Y représente un atome de soufre ou le groupement $-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{S}-$

W représente un groupement $-\text{NH}-$ ou un groupement $-\text{CH}_2-$

p représente un entier allant de 1 à 50

25 R₁ représente un groupement choisi parmi les radicaux suivants :



dans lesquels R' représente H ou un groupement hydrophile, comme par exemple un composé hydrocarboné polyhydroxylé en C₄-C₂₄. Notamment R' peut être choisi parmi les sucres comme par exemple le galactose, le glucose, le mannose, l'acide sialique, lié par son carbone anomère.

5 R représente un groupement choisi parmi : les radicaux hydrocarbonés en C₄-C₂₄ ; les radicaux hydrocarbonés fluorés en C₄-C₂₄ ; les radicaux thioalkyls en C₄-C₂₄.

Les chaînes R préférées sont celles qui contribuent à donner aux tensioactifs de formule (IB) une Concentration Micellaire Critique (CMC) inférieure à 10⁻⁵ M. Une CMC basse apporte en effet à la nanoparticule une stabilité thermodynamique plus 10 importante ainsi qu'une capacité de rétention plus importante des solutés encapsulés dans le compartiment hydrophobe interne. De préférence R représente une chaîne hydrocarbonée en C₁₂-C₂₄ ou une chaîne hydrocarbonée fluorée en C₈-C₂₄.

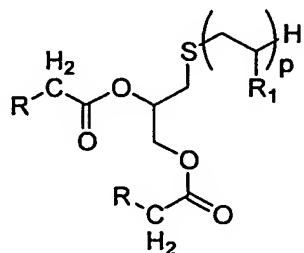
15 La synthèse des molécules de formule (IB) peut être faite de façon simple en utilisant les méthodes classiques de la synthèse organique. Plusieurs exemples de synthèse sont illustrés dans la partie expérimentale.

En résumé, lorsque la molécule de formule (IB) est synthétisée avec un groupement R de type thioalkyle, celle ci est utilisée comme agent de transfert dans une réaction de télomérisation en présence du réactif polymérisable hydrophile (de type Tris(hydroxymethyl) acrylamidométhane ou ses dérivés ou vinylpyrrolidone) et d'un 20 amorceur radicalaire tel que l' α,α' azobisbutyronitrile (AIBN) en solution dans le méthanol, le THF ou l'acétonitrile portés à l'ébullition. La proportion initiale de monomère polymérisable et d'agent de transfert permet de contrôler le degré de polymérisation du télomère et donc la solubilité du produit. Ces derniers sont obtenus par précipitation dans l'éther.

25 Les composés de formule (IB) préférés sont ceux pour lesquels Y représente S.

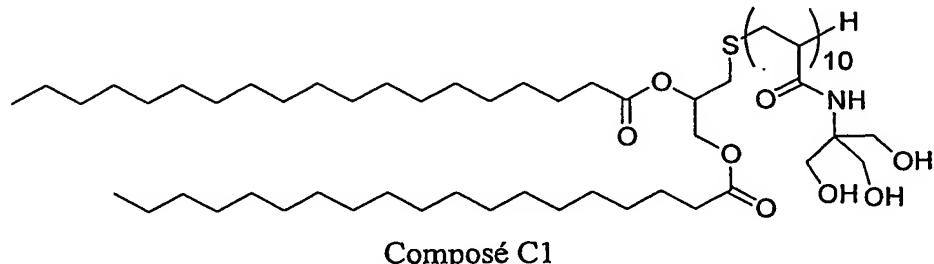
Une autre variante préférée est celle dans laquelle p représente un entier allant de 5 à 15.

30 De façon encore plus avantageuse, on préfère les composés répondant à la formule C ci-dessous dans laquelle R a la même définition que ci-dessus, p représente un entier allant de 5 à 15, W=CH₂ :



Composé C

Parmi ceux-ci un composé particulièrement préféré est C1 représenté ci-dessous :



5

Un autre objet de l'invention consiste dans l'utilisation des composés de formule (I), avantageusement des composés de formule (IB) pour la préparation de nanoparticules à cavité hydrophobe et les nanoparticules ainsi obtenues. Les particules sont fabriquées à partir des tensioactifs de formule (I) ou (IB) très facilement par la méthode du film qui est bien connue de l'homme du métier et qui est décrite dans l'ouvrage *Liposomes, a practical approach*, R.R.C. New, Ed., Oxford University Press, New-York, 1990. On procède comme exposé ci-dessus pour les composés de formule (IA).

De façon étonnante, à partir des composés de formule générale (IB), dont la valeur de p est inférieure à 15 et lorsque R représente une chaîne hydrocarbonée comprenant au moins 12 atomes de carbone, on observe la formation de nanoparticules de forme allongée, désignées ellipsoïdes en raison de leur forme en grain de riz (figure 7a).

Etude des particules ellipsoïdes obtenues à partir des composés de structure (IB)

En effet, à partir des dérivés de formule générale (IB), lorsque p est compris entre 5 et 15, on observe la formation de particules originales dont la forme évoque un grain de riz et dont la taille diminue lorsque p augmente (figure 8). Lorsque p est supérieur à 15 la taille des objets obtenus est inférieure à 10 nm et la nature des agrégats formés est essentiellement micellaire.

La taille et la stabilité mécanique dans le temps des particules obtenues dans la solution ont été mesurées après filtration par diffraction dynamique de la lumière (High Performance Particle Sizer, Malvern). La nature des particules obtenues a été étudiée par microscopie électronique par transmission après coloration négative de l'échantillon ou après cryofracture. La Concentration d'Agrégation Critique de ces tensioactifs a été déterminée par tensiométrie et par spectrofluorimétrie par la méthode du marqueur fluorescent. En outre la technique de tensiométrie de Wilhelmy a permis de déterminer les tensions superficielles limites et l'aire de la tête polaire à l'interface eau-air (figure 8). Ces composés présentent des CMC relativement basses de l'ordre de 10^{-5} M. La CMC de ces tensioactifs n'évolue quasiment pas en fonction de p (figure 8). Pour faire évoluer cette

20

25

30

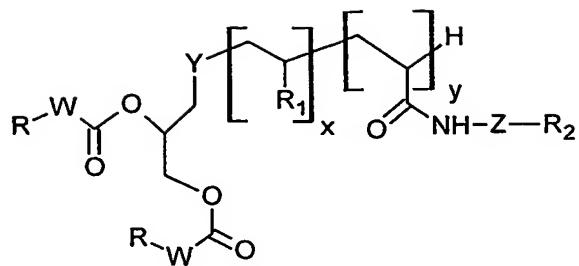
valeur à la baisse ou à la hausse il faut respectivement augmenter ou diminuer la longueur des chaînes hydrocarbonées. La température de transition de phase de ces tensioactifs a été déterminée par spectrofluorimétrie de polarisation et par diffusion de la lumière (figure 9). La température de transition de phase n'évolue quasiment pas pour des longueurs de 5 chaînes constante lorsque p augmente ($41^{\circ}\text{C} < \text{Tm} < 44^{\circ}\text{C}$)

Le diamètre hydrodynamique (D_H) des édifices supramoléculaire suit une loi inverse à la variation du degré de polymérisation moyen des télomères : au plus le volume relatif de la partie polaire est important, au plus la courbure des membranes est importante (figure 8). Ce résultat a été confirmé par microscopie électronique. Au delà de 10 $p=20$, tous les clichés montrent des solutions micellaires (figure 7b). En revanche, en deçà de cette valeur, ils présentent des édifices supramoléculaires ressemblant à des objets oblongs en forme de grain de riz qui ne présentent pas de cavité aqueuse interne en MET après coloration négative (figure 7a).

Par granulométrie, il apparaît que pour le composé de structure (C) avec 15 $p = 5$ et $R = \text{C}_{17}\text{H}_{35}$, le diamètre hydrodynamique des particules obtenues est de 148 nm. Ces objets présentent une stabilité très grande dans le temps qui augmente proportionnellement à la valeur de p (de 2 semaines pour $p=5$ à plusieurs mois pour $p=25$).

Ces particules ellipsoïdales présentent des caractéristiques de structure 20 originales et leur diamètre hydrodynamique moyen peut être modulé aisément par la variation de p , c'est-à-dire du nombre de motifs monomériques constituant la partie hydrophile polymérique. Les particules de l'invention ont également montré une capacité à encapsuler des actifs hydrophobes. Cette incorporation peut être réalisée en utilisant les techniques bien connues de l'homme du métier. Par exemple, l'encapsulation peut être réalisée par dissolution de l'actif dans une solution préformée d'ellipsoïdes ou de micelles, 25 par la procédure huile dans l'eau ou par dialyse. Les composés thérapeutiques qui peuvent être encapsulés sont tous les composés, de préférence hydrophobes, qui peuvent être incorporés de manière stable à ces édifices micellaires ou ellipsoïdes. Différentes familles de principes actifs peu hydrophiles ou hydrophobes peuvent être encapsulés ou dissous par l'intermédiaire de ces objets incluant les anticancéreux, des antibiotiques, des 30 immunomodulateurs, des stéroïdes, des antiinflammatoires ou des nucléotides. Les composés hydrophiles susceptibles de se complexer à la partie polaire des nanoparticules peuvent également être encapsulés ou vectorisés. La dose d'actif effectivement encapsulée dans ces nanoparticules est déterminée après filtration de l'actif non encapsulé par CLHP, par spectrométrie UV ou de fluorescence ainsi que par RMN ^1H .

35 Outre les composés de formule (I), les nanoparticules, micellaires, ellipsoïdales ou liposomes, de l'invention peuvent comporter en outre de préférence au moins un composé répondant à la formule (II) ci-dessous :



(II)

5

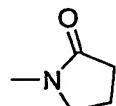
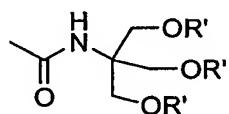
dans laquelle :

- Y représente un atome de soufre ou le groupement $-\text{NH}-\text{CO}-(\text{CH}_2)_n-\text{X}$ dans lequel X représente un atome de soufre S ou un groupement $-\text{CH}_2-$, n est un entier allant de 0 à 10 ;

10

- W représente un groupement $-\text{NH}-$ ou $-\text{CH}_2-$
- x représente 0 ou un nombre entier allant de 1 à 30 ;
- y représente 0 ou un nombre entier allant de 1 à 10 ;
- R_1 représente un groupement hydrophile choisi parmi les radicaux suivants :

15



dans lesquels R' représente H ou un groupement hydrophile, comme par exemple un composé hydrocarboné polyhydroxylé en $\text{C}_{4\text{-}}\text{C}_{24}$; notamment R' peut être choisi parmi les sucres comme par exemple le galactose, le glucose, le mannose, l'acide sialique, lié par son carbone anomère ;

20

- R_2 représente un groupement de reconnaissance qui est choisi en fonction de la cible cellulaire, de préférence il est choisi parmi les groupements ayant une affinité prononcée pour la cible biologique du principe actif véhiculé dans la nanoparticule.

25

R_2 peut être de nature saccharidique (ciblage des lectines membranaires spécifiques qui se retrouvent dans des tissus particuliers et qui reconnaissent sélectivement soit le galactose –cas du foie, des os, de certaines tumeurs cancéreuses-, soit le mannose –cas des macrophages, du cœur-, soit l'acide sialique- cas des érythrocytes -...), de nature hormonale (tels que des stéroïdes), de nature synthétique tel que le gleevek pour cibler les kinases, des anticorps spécifiques, la biotine qui se lie à certaines protéines spécifiques, et plus généralement tout substrat dont les recherches antérieures ont démontré la spécificité de reconnaissance. On peut citer, par exemple, parmi les peptides utilisables dans la présente invention : la séquence RGD, connue pour son affinité pour les intégrines $\alpha\text{V}\beta 3$.

On peut prévoir qu'une même molécule de formule (II) comporte un ou plusieurs groupements R_2 de reconnaissance identiques ou plusieurs groupements de reconnaissance R_2 différents, ce qui permet de diriger les particules vers plusieurs cibles biologiques distinctes.

5 - Le groupement R obéit aux mêmes règles que celles précédemment définies pour la structure du composé de formule (I).

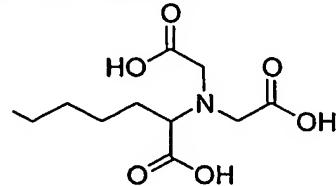
10 - Z est un bras espaceur qui relie le groupement de reconnaissance R_2 à la chaîne polymérique. Z est lié à R_2 au moyen d'une liaison qui peut être choisie parmi les fonctions $-O-CO-$, $-CO-NH-$, $-NH-CO-NH-$, $-NH-CO-O-$, $O-CO-O-$, $-O-$, $-CH=N-$, $-S-$ ou par complexation d'un atome de nickel (WoodleChikh et Lasical., Biochim. Biophys. Acta, 1113 (1992) 171-1999).Acta, 1567 (2002) 204-212). Celui ci peut se lier d'une part à un tag de polyhistidine fixé sur l'agent de ciblage et d'autre part à un polyacide de type NTA fixé sur la chaîne polymérique.

15 Le bras espaceur Z peut être constitué d'une chaîne peptidique. Celle-ci peut être fixée sur la chaîne oligomérique par l'intermédiaire de la chaîne latérale ou principale de l'aminoacide situé en extrémité. Ce bras espaceur comprend 1 à 5 acides aminés, préférentiellement 1 à 3 acides aminés.

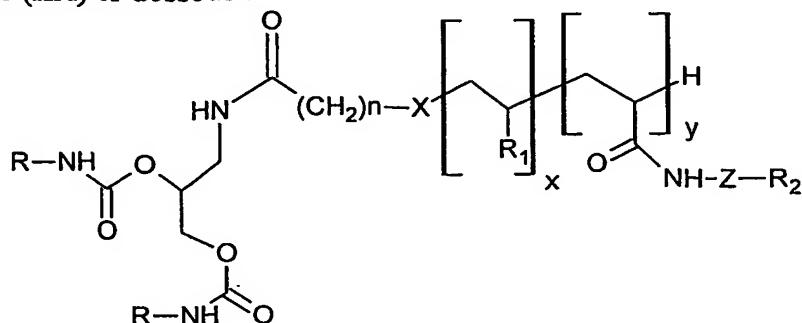
20 Les acides aminés constituant le bras espaceur Z, sont choisis parmi les acides aminés naturels comme lalanine, larginine, l'asparagine, l'acide aspartique, la cystéine, la glutamine, l'acide glutamique, la glycine, lhistidine, lisoleucine, la leucine, la lysine, la méthionine, la phénylalanine, la proline, la sérine, la thréonine, le tryptophane, la tyrosine, la valine, ou les acides aminés non naturels tels que lhydroxyproline, la norleucine, lornithine, la citrulline, la cyclohexylalanine. Ce bras espaceur Z peut être constitué d'un résidu tyrosine permettant le suivi *in vivo* du vecteur après marquage à ^{125}I ou ^{131}I .

25 On peut également envisager d'employer comme groupement Z des acides Ω -aminés tels que l'acide 3-aminopropionique et l'acide 4-amino-butyrique, mais également l'éthanolamine, la 3-propanolamine ou des diamines de formule $-NH-(CH_2)_r-NH-$ dans laquelle r représente un entier allant de 2 à 6.

30 Lors d'une liaison par complexation d'un atome de nickel, le groupement $-Z-R_2$ est constitué par un groupement NTA de formule :



Selon la première variante de l'invention qui concerne les liposomes formés à partir de molécules de formule (IA), les composés de formule (II) préférés sont ceux de formule (IIA) ci-dessous :



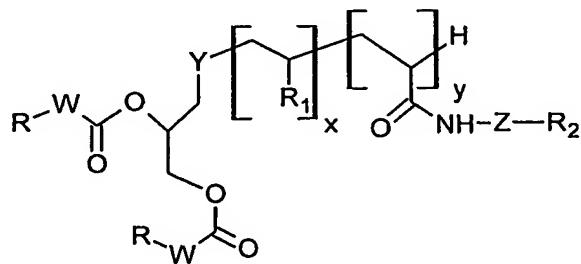
(IIA)

dans laquelle X, n, x, y, R, R₁ et R₂ ont la même définition que ci-dessus dans la formule (II).

- de préférence x et y ne sont pas nuls simultanément ;
- de préférence X représente S ;
- de préférence n=2.

Selon la seconde variante de l'invention qui concerne les liposomes formés à partir de molécules de formule (IB), les composés de formule (II) préférés sont ceux de formule (IIB) ci-dessous :

15



(IIB)

20

dans laquelle :

- Y représente un atome de soufre ou le groupement -NH-CO-CH₂CH₂S-
- W, x, y, Z, R, R₁, R₂ ont la même définition que dans la formule (II) ci-dessus.

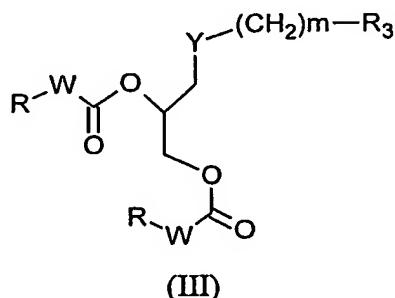
25

De préférence, les nanoparticules (liposomes, vésicules tubulaires, micelles ou particules ellipsoïdales) de l'invention comportent de 1 à 5% d'un ou plusieurs composés de formule (II) ce qui permet de favoriser le ciblage de ces nanoparticules vers leur cible biologique sans altérer leur organisation.

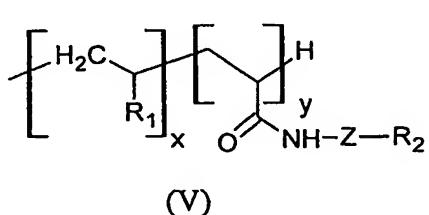
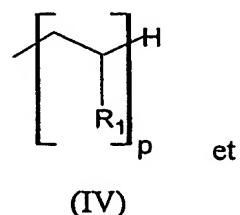
Ces télomères lipidiques de formule (II) présentent l'avantage grâce à leur partie hydrophile oligomérique de pouvoir éloigner les agents de reconnaissance greffés de la surface des vésicules tubulaires, favorisant ainsi leur reconnaissance par les cellules ou les tissus cibles. L'autre avantage lié à l'utilisation de ces lipides de ciblage (II) 5 est la possibilité de multiplier les motifs de reconnaissance sur un seul composé grâce à la technique de télomérisation. Les facteurs x et y sont en effet faciles à contrôler et vont dépendre assez étroitement de la proportion de monomères et d'agent télogène mis en réaction.

La ligation des agents de reconnaissance peut être réalisée avant la 10 télomérisation de la tête hydrophile si il y a compatibilité avec les conditions réactionnelles. Les agents de reconnaissance peuvent également être fixés sur la tête polaire oligomérique après formation des vésicules tubulaires. La partie hydrophile télomérisée est alors fonctionnalisée par des groupements susceptibles d'assurer le couplage avec ces agents de reconnaissance. Les différentes techniques de couplage 15 susceptibles d'être utilisées sont bien connues de l'homme du métier et elles sont notamment décrites dans : Allen et al., Biochim. Biophys. Acta, 1237 (1995) 99-108 ; Sapra, Prog. Lipids Res., 42 (2003) 439-462, Hansen et al., Biochim. Biophys. Acta, 1239 (1995) 133-144.

Les composés de formule (II) constituent un autre objet de l'invention.
20 Les composés de formule (I) et de formule (II) décrits ci-dessus peuvent être regroupés sous une même formule (III) :

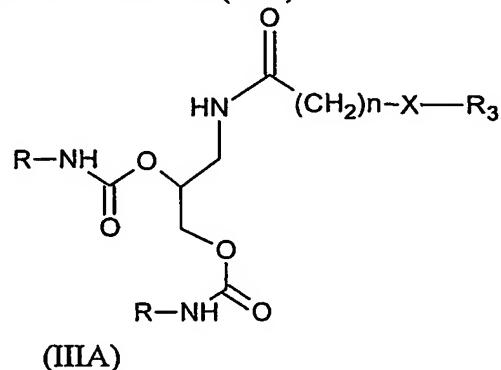


25 dans laquelle R, W, m et Y ont la même définition que dans les formules (I) et (II) ci-dessus et R₃ représente un groupement choisi parmi :



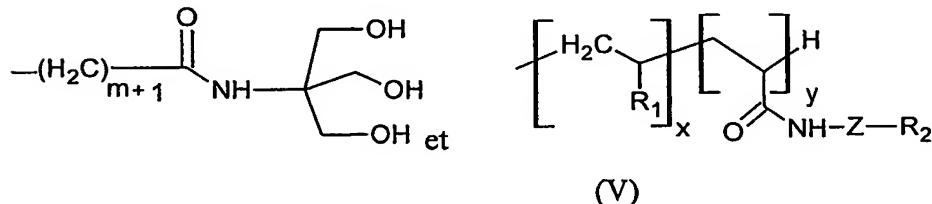
R_1 ayant la même définition que dans les formules (I) et (II), p ayant la même définition que dans la formule (I), x , y , Z , R_2 ayant la même définition que dans la formule (II).

En particulier, les composés de formule (IA) et de formule (IIA) peuvent être regroupés sous une formule commune (IIIA) :



dans laquelle X , n et R ont la même définition que dans les formules (IA) et (IIA) et R_3 représente un groupement choisi parmi :

10

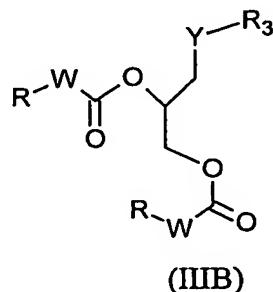


15

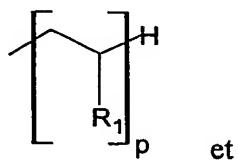
m ayant la même signification que dans la formule (IA)

R_1 , R_2 , Z , x et y ayant la même signification que dans la formule (IIA)

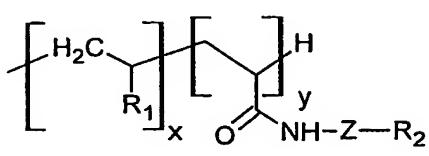
Les composés de formule (IB) et de formule (IIB) définis ci-dessus peuvent être regroupés sous une formule commune (IIIB) :



dans laquelle R, W et Y ont la même définition que dans les formules (IB) et (IIB) et R₃ représente un groupement choisi parmi :



et



5

R₁ ayant la même définition que dans les formules (IB) et (IIB), p ayant la même définition que dans la formule (IB), x, y, Z, R₂ ayant la même définition que dans la formule (IIB).

10

Selon une variante préférée de l'invention, les liposomes ou vésicules tubulaires de l'invention formés à partir des composés de formule (IA), et éventuellement (IIA) sont stabilisés par télomérisation ou polymérisation d'un monomère de type acrylique contenu dans leur cavité aqueuse interne.

15

De manière à limiter le relargage des solutés encapsulés dans ces vésicules tubulaires et à augmenter leur stabilité mécanique il est possible d'introduire à l'intérieur du compartiment aqueux interne des vésicules tubulaires une matrice oligomérique ou polymérique. La matrice oligomérique est fabriquée après encapsulation du ou des monomères constitutifs dans les vésicules tubulaires et élimination des monomères non encapsulés par des techniques de séparation sur gel d'exclusion de taille. 20 La télomérisation, qui consiste à former le polymère en présence d'un agent de transfert de chaîne, permet d'accéder à des petits polymères de taille contrôlée. La masse moléculaire réduite de ce polymère favorise son élimination par voie rénale. En évitant l'accumulation de polymère dans le lysosome on évite également des problèmes de toxicité.

25

Les nanoparticules, liposomes ou vésicules tubulaires, comprenant, outre les tensioactifs de formule (IA), au moins un oligomère ou télomère tel que décrit ci-dessous constituent un autre objet de l'invention.

30

L'oligomère ou le télomère est constitué de blocs de construction monomériques, hydrophiles, ioniques ou non ioniques, choisis parmi les dérivés acide acrylique, acide méthacrylique, méthacrylamide, ainsi que les dérivés acrylate, méthacrylate, acrylamide et méthacrylamide d'alcools en C₁-C₆, de polyols en C₂-C₁₂, de sucres et d'aminoacides.

Ces sucres peuvent être

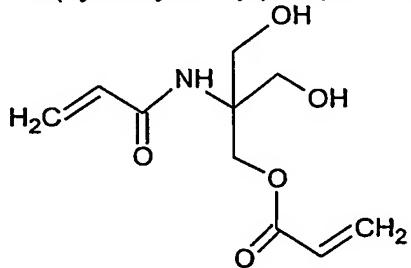
- Des sucres simples tels que : le glucose, ribose, arabinose, xylose, lyxose, allose, altrose, mannose, galactose, fructose, talose.

- Des disaccharides tels que le maltose, le saccharose, ou le lactose

Les aminoacides peuvent être choisis parmi les acides aminés naturels comme l'alanine, l'arginine, l'asparagine, l'acide aspartique, la cystéine, la glutamine, l'acide glutamique, la glycine, l'histidine, l'isoleucine, la leucine, la lysine, la méthionine, la 5 phénylalanine, la proline, la sérine, la thréonine, le tryptophane, la tyrosine, la valine, ou les acides aminés non naturels tels que l'hydroxyproline, la norleucine, l'ornithine, la citrulline, la cyclohexylalanine.

Parmi les monomères commercialement disponibles utilisables dans le procédé de l'invention, on peut mentionner par exemple : Le Tris(hydroxy)méthyl 10 acrylamidométhane, l'acrylate de sodium, l'hydroxyéthyl acrylate, le glucose monoacrylate, le glucose-1-(N-méthyl)acrylamide, le glucose 2-acrylamide, le maltose 1-acrylamide, le monoacrylate de sorbitol.

Afin de modifier les capacités de rétention et de stabilisation du télomère il est possible d'utiliser dans la fabrication du télomère des agents de réticulation 15 hydrosolubles tels que : le glucose-1,2-diacrylamide, le sorbitol diacrylate, le saccharose diacrylate, le saccharose di(éthylènediamine acrylamide), le kanamycin tétracrylamide, le kanamycin diacrylamide, ou d'autres sucres di ou polyfonctionnalisés par des acrylates ou des acrylamides. En règle générale tous les composés hydrophiles susceptibles de recevoir au moins deux groupements acrylate ou acrylamide peuvent être utilisés. C'est le cas par 20 exemple du dérivé acrylate de tris(hydroxyméthyl) acrylamidométhane (composé E):

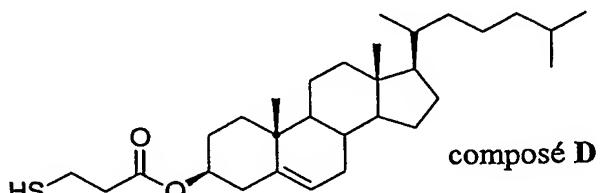


Composé E

Ces agents de réticulation sont utilisés dans des proportions allant de 1 à 25 5% en poids par rapport au poids du ou des monomères.

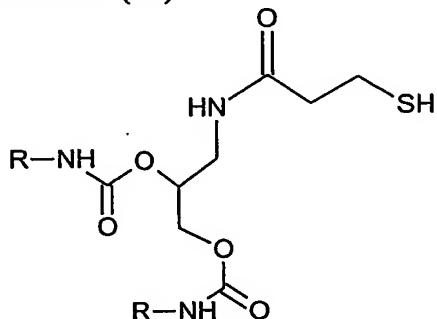
La taille du télomère est contrôlée en utilisant un ou plusieurs agents de transfert hydrophiles ou hydrophobes qui sont insérés dans la membrane ou la cavité aqueuse interne des nanoparticules et particulièrement des vésicules tubulaires. L'agent de transfert de chaîne peut être hydrophile ou hydrophobe, de type thiol ou phosphite. Les 30 agents de transfert de chaîne employés sont choisis parmi les thiols hydrophiles tels que l'acide thiol acétique, l'acide mercaptopropionique, le thioéthylene glycol, la cystamine, la cystéine ou les thiols hydrophobes tels que les alcane thiols de C₂ à C₃₀, comme par exemple le composé D (dérivé du cholestérol) qui est connu pour sa capacité à s'intégrer

dans les membranes phospholipidiques. La synthèse du composé D est décrite notamment dans M. Wathier et al., Chem. Phys. Lipids (2002), 115, 17-37.



5 L'agent de transfert de chaîne peut encore être choisi parmi les thiols bicaudinaires précédemment décrits. Les phosphites peuvent quant à eux être hydrophiles tels que le phosphite de diéthyle ou hydrophobes tels que les phosphites de dioctyle, didodécyle, dihexadécyle.

10 Afin d'éviter de désorganiser la membrane des vésicules tubulaires il est préférable que la structure hydrophobe de ces thiols hydrophobes se rapproche de celle des tensioactifs la constituant. Le motif commun de ces agents télogènes est avantageusement constitué d'un motif aminoglycérol sur lequel sont greffées des chaînes grasses par des liaisons carbamate suivant la formule (VI) :



15 (VI)

dans laquelle R a la même signification que dans les formules (I) (II) et (III) ci-dessus.

Afin de moduler le degré de polymérisation il est possible de faire varier la proportion d'agent de transfert de chaîne incorporée dans la membrane par rapport à la 20 quantité de monomères encapsulés. Le rapport de l'agent de transfert de chaîne / tensioactif lipidique (I) varie préférentiellement de 1 à 10% en poids/poids. Le rapport agent de transfert de chaîne / monomère varie de 0,1 à 10 % en poids/poids.

La polymérisation peut être initiée de façon connue par irradiation ultraviolette ou par des photoinitateurs, par des couples d'initiateurs redox, par la chaleur 25 ou par des initiateurs radicalaires thermiques et plus généralement par toutes les techniques classiques décrites dans la littérature (G. Odian, Principles of polymerization, 3.sup.rd Ed, Wiley, New York, 1991).

A la fin de la polymérisation, la cavité aqueuse interne des vésicules tubulaires comporte un télomère hydrophile muni éventuellement d'une partie hydrophobe télogène intégrée dans le feuillet membranaire interne. La description physico-chimique de ces vésicules tubulaires stabilisées est donnée dans la partie expérimentale et leur capacité de rétention supérieure d'un soluté encapsulé et leur stabilité mécanique accrue sont démontrées.

Les applications visées incluent le transport de principes actifs, notamment de principes actifs thérapeutiques, la délivrance épidermique de substances cosmétiques, les agents de diagnostic médical. Notamment le transport d'actifs anticancéreux, de vaccins, de matériel génétique, d'enzymes, d'hormones, de vitamines, de sucres, de protéines et de peptides, de lipides, de molécules organiques et inorganiques.

Dans le cadre d'une utilisation vaccinale, les épitopes et peptides pourront être incorporés dans la matrice aqueuse interne ou exprimés à la surface des vésicules tubulaires par un système de liaison covalente afin d'améliorer la réponse immunitaire des épitopes.

La présente invention a donc en outre pour objet toute composition, notamment toute composition thérapeutique, de diagnostic vaccinal ou cosmétique comprenant au moins un principe actif en association avec une nanoparticule, liposome, vésicule tubulaire, ellipsoïde ou micelle, telle que décrite ci-dessus, et en particulier toute composition comprenant au moins un principe actif encapsulé dans un liposome ou vésicule tubulaire, ellipsoïde ou micelle selon la présente invention.

PARTIE EXPERIMENTALE

FIGURES :

La figure 1 illustre la cinétique de libération de la carboxyfluorescéine encapsulée dans des liposomes de phosphatidyl choline (+) et des vésicules tubulaires constituées du composé A1 (●) mesurée en spectrofluorimétrie.

La figure 2 représente le spectre infra rouge en phase liquide d'une solution du composé A1 dans CCl₄ à différentes concentrations (1.10⁻² à 2,5.10⁻⁴M).

La figure 3 représente la courbe de distribution en taille par volume des vésicules tubulaires, mesurée par microscopie électronique.

La figure 4 est une photographie obtenue par microscopie électronique par transmission de phase après coloration négative à l'acétate d'uranyle 2% de vésicules tubulaires formées par dispersion du composé A1 (2,5 mg.ml⁻¹) dans l'eau.

La figure 5 est une photographie obtenue par microscopie électronique par transmission de phase après cryofracture d'un échantillon de vésicules tubulaires formées par dispersion du composé A1 (2,5 mg.ml⁻¹) dans l'eau.

La figure 6 est une photographie obtenue par microscopie électronique par transmission de phase après coloration négative à l'acétate d'uranyle 2% d'un échantillon de vésicules tubulaires formées par dispersion du composé de structure B (2,5 mg.ml⁻¹) dans l'eau.

5 La figure 7 représente des clichés de Microscopie Electronique par Transmission de phase (coloration négative à l'acétate d'uranyle 20 %) de dispersions aqueuses de composés de formule C avec R=C₁₇H₃₅ et p=5 (a) et R=C₁₇H₃₅ et p=20 (b), et de microscopie électronique après cryofracture du composé de formule C avec R=C₁₇H₃₅ et p=8 (c)

10 La figure 8 est un tableau rassemblant les résultats d'étude physico-chimique et granulométrique de dispersions aqueuses des composés de structure C avec R=C₁₇H₃₅, et p variable.

La figure 9 représente les températures de transition de phase mesurées par diffusion de lumière et rappel des valeurs mesurées en spectrofluorimétrie

15 **Exemple 1 : synthèse du dérivé A1**

La synthèse du dérivé A1 est résumée dans le schéma 1

• Acide trityl mercaptopropionique (1) : molécule disponible commercialement.

• rac-N-(2,3-Dihydroxy-propyl)-3-(tritylmercapto) propionamide (2)

20 2 g d'acide 3-(tritylmercapto) propanoïque (5,75 mmol), 0,523 g d'aminopropane diol (1 éq) et 1,7 g de N-(Ethoxycarbonyl)-2-ethoxy-1,2-dihydroquinoline (EEDQ) (6,9 mmol, 1,2 éq) sont solubilisés dans 50 mL de dichlorométhane. Le milieu réactionnel est chauffé à reflux durant 16 heures. Le brut réactionnel est ensuite lavé avec une solution de bicarbonate de sodium saturée puis avec une solution d'acide chlorhydrique normale, saturée en chlorure de sodium avant d'être séché sur sulfate de sodium. Après filtration sur verre fritté, le produit est purifié par chromatographie sur gel de silice avec élution par un gradient d'acétate d'éthyle pur à acétate d'éthyle/méthanol 9 :1 (v :v)). Le produit pur est obtenu sous la forme d'une poudre blanche (2,12 g, Rdt : 87%).

30 Le produit peut aussi être obtenu pur, avec un rendement identique, par cristallisation à température ambiante du brut réactionnel dans un mélange acétate d'éthyle/méthanol 8 :2 (v :v) en 8 jours.

RMN ¹H(/CDCl₃) : δ (ppm) 7,40-7,25 (15H, m, aromatiques du trityle) ; 5,86 (1H, t, NH) ; 3,7 (1H, m, CH₂OH) ; 3,51 (2H, m, CH₂OH) ; 3,31 (2H, m, CH₂NH) ; 3,09 (2H, m, OH) ; 2,50 (2H, t, CH₂S) ; 2,04 (2H, m, SCH₂CH₂CO).

35 RMN ¹³C(/CDCl₃) : δ (ppm) 172,9 (CH₂CONH) ; 144,6 (SCC phényl) ; 129,6 (C_{para} phényl) ; 128,0 (C_{ortho} phényl) ; 126,8 (C_{méta} phényl) ; 70,9 (CHOH) ; 66,9 (SCPh₃) ; 63,6 (CH₂OH) ; 42,1 (NHCH₂CH) ; 35,3 (SCH₂CH₂CO) ; 27,6 (CH₂S).

- Rac-2,3-di[N-(heptadécy1)carbamoyloxy-propyl]-3-(*tritylmercapto*) propionamide (3)

2 g de rac-*N*-(2,3-Dihydroxy-propyl)-3-(*tritylmercapto*) propionamide (4,75 mmol) et 2,8 g de 1-Isocyanato-heptadecane (9,97 mmol, 2,1 éq) sont solubilisés dans 50 mL de toluène fraîchement distillé, à température ambiante et sous bullage d'argon. Le milieu réactionnel est porté au reflux et une pointe de spatule de 1,4-diaza bicyclo-[2,2,2]-octane (DABCO) (cat.) est ajoutée au mélange. Au bout de 6 heures, le brut est évaporé à sec et repris dans un minimum d'éther où le produit cristallise à température ambiante. Après filtration, le produit est obtenu pur sous la forme d'une poudre blanche (4,04 g, Rdt : 86 %).

RMN ^1H (CDCl_3) : δ (ppm) 7,47-7,23 (15H, m, aromatiques du trityle) ; 6,02 (1H, t, NH) ; 4,95-4,74 (3H, m, CHO , CH_2O) ; 4,18 (2H, m, NH) ; 3,44 (2H, t, CH_2NH) ; 3,12 (4H, q, CH_2NH) ; 2,51 (2H, t, CH_2S) ; 2,06 (2H, t, $\text{SCH}_2\text{CH}_2\text{CO}$) ; 1,49 (4H, m, NHCH_2CH_2) ; 1,28 (54H, m, CH_2 chaînes) ; 0,91 (6H, t, CH_3).

RMN ^{13}C (CDCl_3) : δ (ppm) 171,2 (CH_2CONH) ; 156,1-155,9 (OCONH) ; 144,7 (SCC phényl) ; 129,6 (C_{para} phényl) ; 127,9 (C_{ortho} phényl) ; 126,7 ($\text{C}_{\text{méta}}$ phényl) ; 71,2 (CHO) ; 66,8 (SCPh_3) ; 63,4 (CH_2O) ; 41,2 (NCH_2CH_2) ; 40,0 (NHCH_2CH) ; 35,5 ($\text{SCH}_2\text{CH}_2\text{CO}$) ; 31,9 (NCH_2CH_2) ; 29,9-29,3 (chaînes) ; 27,6 (CH_2S) ; 22,7 (CH_2CH_3) ; 14,1 (CH_3)

- Rac-2,3-di[N-(heptadécy1)carbamoyloxy-propyl]-3-mercaptopropionamide (4)

2 g du composé 3 (2,03 mmol) et 0,236 g de triéthylsilane (2,03 mmol, 1 éq) sont solubilisés dans un minimum de dichlorométhane et refroidis à 0° C par un bain de glace. Une solution à 10 % d'acide trifluoroacétique dans le dichlorométhane est ajoutée, à froid, goutte à goutte, par l'intermédiaire d'une ampoule à brome. Dès la fin de l'addition, le milieu est ramené à température ambiante et laissé sous agitation durant 3 heures. Après évaporation à sec, reprise dans le dichlorométhane et lavages à l'eau distillée saturée en chlorure de sodium puis avec une solution saturée en bicarbonate de sodium, le brut est évaporé à sec et repris dans l'acétate d'éthyle où il cristallise à froid. Le produit pur est récupéré sous la forme d'une poudre blanche (1,3 g, Rdt : 86 %).

RMN ^1H (CDCl_3) : δ (ppm) 6,46 (1H, t, NH) ; 4,97-4,95 (3H, m, CHO , CH_2O) ; 4,21 (2H, m, NH) ; 3,50 (2H, t, CH_2NH) ; 3,16 (4H, q, CH_2NH) ; 2,81 (2H, q, CH_2S) ; 2,51 (2H, t, $\text{SCH}_2\text{CH}_2\text{CO}$) ; 1,64 (1H, t, SH) ; 1,50 (4H, m, NHCH_2CH_2) ; 1,27 (54H, m, CH_2 chaînes) ; 0,89 (6H, t, CH_3).

RMN ^{13}C (CDCl_3) : δ (ppm) 170,9 (CH_2CONH) ; 156,1-156,0 (OCONH) ; 71,3 (CHO) ; 63,5 (CH_2O) ; 41,2 (NCH_2CH_2) ; 40,4 (NHCH_2CH) ; 35,5 ($\text{SCH}_2\text{CH}_2\text{CO}$) ; 31,9 (NCH_2CH_2) ; 29,9-29,4 (chaînes) ; 22,7 (CH_2CH_3) ; 20,4 (CH_2S) ; 14,1 (CH_3).

- Composé A1 acétylé

0,5 g de composé 4 (0,67 mmol) et 1,01 g de THAM triacétylé (3,37 mmol, 5 éq) sont solubilisés dans 30 mL de triéthylamine fraîchement distillée. Le mélange est porté à 50°C sous bullage d'Argon durant 2 heures puis ramené à température ambiante et évaporé à sec. Le brut est repris dans l'acétate d'éthyle pour être lavé avec une solution aqueuse normale d'acide chlorhydrique puis avec une solution aqueuse saturée en bicarbonate de sodium. Le produit est ensuite purifié par chromatographie sur gel de silice sur colonne éluée à l'acétate d'éthyle pur. Après évaporation et séchage, le produit est obtenu pur sous la forme d'une poudre blanche (0,33 g, Rdt : 46 %).

RMN ¹H(/CDCl₃) : δ (ppm) 6,48 (1H, t, CONHCH₂) ; 6,37 (1H, s, CONHC) ; 5,05-4,96 (3H, m, CHO, CH₂O) ; 4,45 (6H, s, CH₂O) ; 4,22 (2H, m, NH) ; 3,48 (2H, t, CH₂NH) ; 3,17 (4H, q, CH₂NH) ; 2,81 (2H, q, CH₂S) ; 2,49 (4H, t, SCH₂CH₂CO) ; 2,10 (9H, s, CH₃) ; 1,44 (4H, m, NHCH₂CH₂) ; 1,27 (54H, m, CH₂ chaînes) ; 0,90 (6H, t, CH₃).

RMN ¹³C(/CDCl₃) : δ (ppm) 171,7-171,5 (CH₂CONH) ; 170,6 (OCO) ; 156,2-156,0 (OCCONH) ; 71,2 (CHO) ; 63,6 (CH₂O) ; 62,5 (CH₂O) ; 41,2 (NCH₂CH₂) ; 40,2 (NHCH₂CH) ; 37,1-36,6 (SCH₂CH₂CO) ; 31,9 (NCH₂CH₂) ; 29,8-29,3 (chaînes) ; 26,8 (CH₃) ; 22,6 (CH₂CH₃) ; 20,8 (CH₂S) ; 14,1 (CH₃).

25

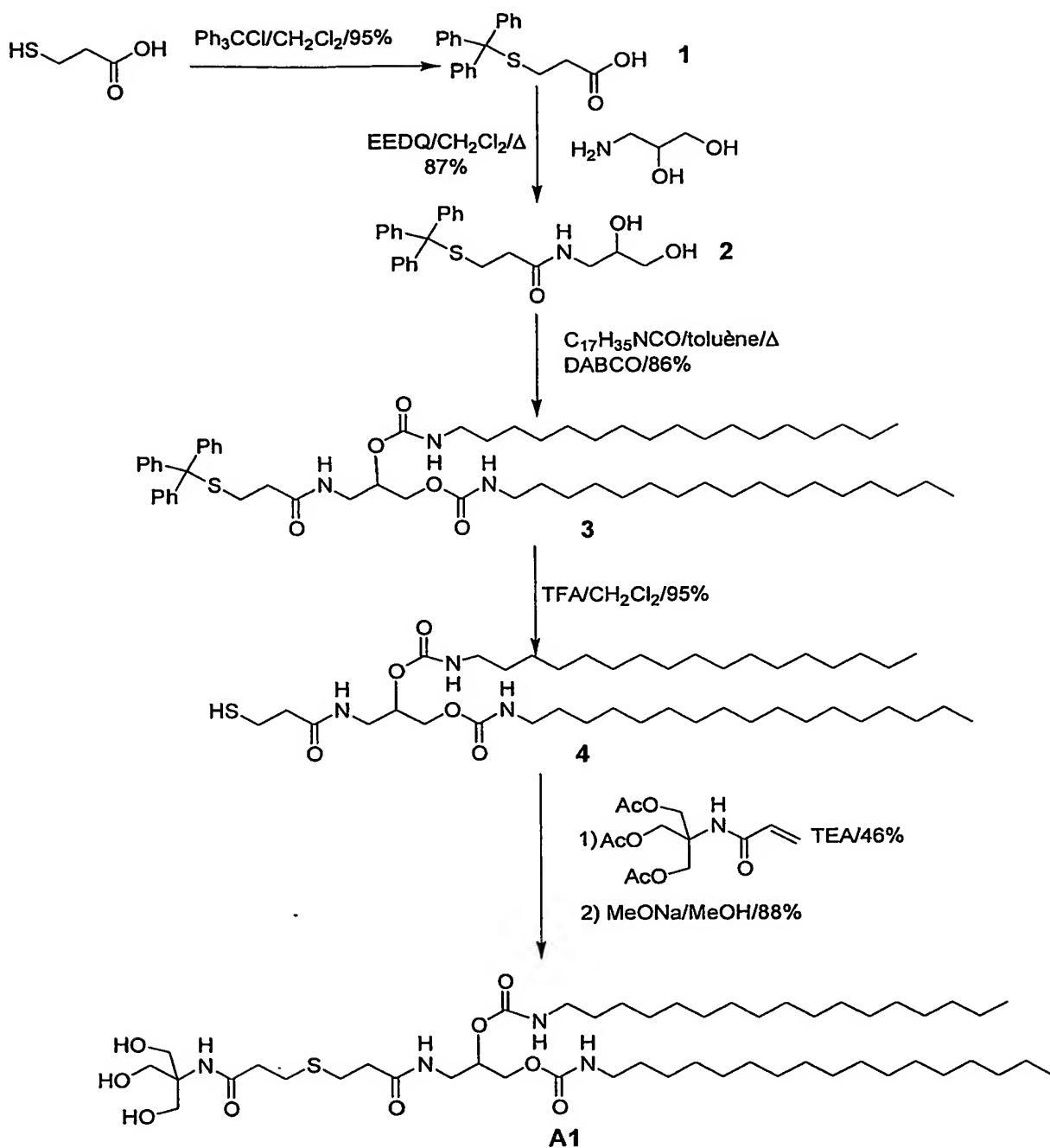


Schéma 1 : synthèse du dérivé A1

5

- Composé A1

0,3 g de dérivé acétylé (0,28 mmol) sont solubilisés dans un minimum de méthanol puis une pointe de spatule de méthylate de sodium (cat.) est ajoutée. Le mélange est laissé sous agitation à température ambiante durant 30 minutes en maintenant le pH entre 8 et 9 par ajout de méthylate de sodium si nécessaire. Le milieu réactionnel est ensuite neutralisé par ajout de quelques gouttes d'une solution aqueuse normale d'acide

10

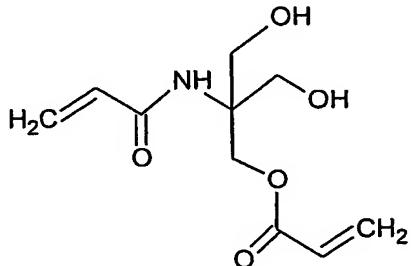
chlorhydrique. Après évaporation à sec, le brut réactionnel est purifié par chromatographie sur gel de silice éluée avec un mélange acétate d'éthyle/méthanol 95:5 (v:v). Le produit est obtenu pur sous la forme d'une poudre blanche (0,233 g, Rdt : 88 %). Pf : 129 °C.

5 RMN ^1H (CDCl₃) : δ (ppm) 7,00 (1H, s, CONHC) ; 6,72 (1H, t, CONHCH₂) ; 5,00 (3H, m, CHO, CH₂O) ; 4,47 (3H, m, OH x3) ; 4,44 (6H, s, CH₂O x3) ; 4,19 (2H, m, NH x2) ; 3,48 (2H, t, CH₂NH) ; 3,16 (4H, q, CH₂NH x2) ; 2,85 (2H, q, CH₂S) ; 2,65-2,50 (4H, t, SCH₂CH₂CO x2) ; 1,44 (4H, m, NHCH₂CH₂ x2) ; 1,28 (54H, m, CH₂ chaînes) ; 0,91 (6H, t, CH₃ x2).

10 RMN ^{13}C (CDCl₃) : δ (ppm) 171,1 (CH₂CONH) ; 156,2-156,0 (OCONH) ; 71,2 (CHO) ; 63,6 (CH₂O) ; 61,0 (CH₂OH) ; 41,2 (NCH₂CH₂) ; 40,2 (NHCH₂CH) ; 37,1-36,6 (SCH₂CH₂CO) ; 31,9 (NCH₂CH₂) ; 29,9-29,3 (chaînes) ; 22,6 (CH₂CH₃) ; 20,41 (CH₂S) ; 14,1 (CH₃).

Exemple 2 : Synthèse de l'agent de réticulation E : l'acide 2-acryloylamino-3-hydroxy-2-hydroxyméthyl-propyl ester acrylique

15



Composé E

20

- Acide 5-acryloylamino-2,2-diméthyl-[1,3]-dioxan-5-yl méthyl ester acrylique

25

1g (4,65 mmol) de THAM isopropylidène est solubilisé dans un minimum de dichlorométhane. Le pH est ajusté et maintenu à 9 par ajout de quelques gouttes de triéthylamine puis une solution contenant 0,378 mL de chlorure d'acryloyle (4,65 mmol, 1 éq.) dans 4 mL de dichlorométhane est additionnée goutte à goutte. La réaction est suivie en CCM (acétate d'éthyle/ cyclohexane 7:3) avec la disparition du THAM isopropylidène (Rf : 0,3). Le milieu est ensuite neutralisé par ajout d'acide formique, évaporé à sec et purifié par chromatographie sur gel de silice à l'aide d'un gradient d'élution acétate d'éthyle/cyclohexane 7:3 à 5:5. Le produit pur est obtenu sous la forme d'une huile jaune (1,1 g, Rdt : 87 %).

30

RMN ^1H (CDCl₃) : δ (ppm) 6,50 (m, 1H, CHCONH), 6,43 (d, 1H, CH_{2b} ester acrylique), 6,30 (s, 1H, NH), 6,22 (d, 1H, CH_{2b} acrylamide), 6,14 (d, 1H, CH₂COO),

5.93 (d, 1H, $\text{CH}_{2\alpha}$ ester acrylique), 5.65 (d, 1H, $\text{CH}_{2\alpha}$ acrylamide), 4.62 (s, 2H, CH_2OCO), 4.42 (d, 2H, CH_2O), 3.80 (d, 2H, CH_2O), 1.49 (d, 6H, $\text{CH}_3\times 2$)

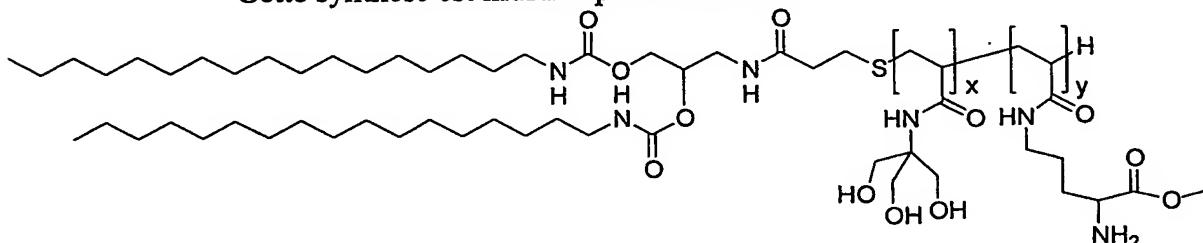
- Acide 2-acryloylamino-3-hydroxy-2-hydroxyméthyl-propyl ester

5 1,1 g (4,08 mmol) d'acide 5-acryloylamino-2,2-diméthyl-[1,3]-dioxan-5-
 yl méthyl ester acrylique et 5,45 g de Montmorillonite K10 sont mélangé dans du
 dichlorométhane et laissés sous agitation à température ambiante durant 4 jours. Ce
 mélange est ensuite filtré sur célite et lavé au méthanol. Le gâteau de célite est repris
 plusieurs fois dans le méthanol sous forte agitation avant d'être à nouveau filtré. Après
 10 évaporation à sec, le produit est obtenu pur sous la forme d'une huile jaune (0,766 g, Rdt :
 82 %).

15 RMN 1 H (CDCl₃) : δ (ppm) 6.73 (s, 1H, NH), 6.42 (d, 1H, CH_{2b} ester acrylique), 6.21 (d, 1H, CH_{2b} acrylamide), 6.14 (d, 1H, CHCOO), 5.88 (d, 1H, CH_{2a} ester acrylique), 5.69 (d, 1H, CH_{2a} acrylamide), 4.70 (m, 2H, OH x2), 4.39 (d, 2H, CH₂O), 3.70 (dd, 4H, CH₂OH).

Exemple 3 : Synthèse d'un télomère lipidique de ciblage G

Cette synthèse est illustrée par le schéma 2.



• Ester méthylique de l'acide 5-Acryloylamino-2-*tert*-

20 butyloxycarbonylamino-pentanoïque (5)

4,00 g du sel d'acétate de la L-(Boc)LysOMe (12,50 mmol – 1 équiv.) sont dissous dans 30 mL de dichlorométhane anhydre. Le pH de la solution est amené à 9 par addition de DIEA puis refroidi à 0°C. 1,87 mL de chlorure d'acryloyle (23 mmol – 1,85 équiv.) sont ajoutés goutte à goutte au mélange réactionnel en maintenant le pH de la solution basique par addition de DIEA. Après 24 heures d'agitation, le milieu est lavé à l'eau puis la phase organique est séchée sur Na₂SO₄. Les solvants sont évaporés sous pression réduite et la purification par chromatographie flash sur gel de silice (éluant : acétate d'éthyle/cyclohexane 8:2) permet d'obtenir le composé 5 (3,67 g, Rdt : 76 %) sous forme d'une huile incolore translucide. [α]_D = + 7,5 (c, 1, CHCl₃).

30 RMN ^1H (250 MHz, DMSO-d6) : δ 8.08 (1H, t, $J = 5.6$ Hz, NH-CO-O),
 7.22 (1H, d, $J = 7.7$ Hz, NH-CO), 6.20 (1H, dd, $J_{\text{cis}} = 9.7$ Hz et $J_{\text{trans}} = 17.1$ Hz, H_c), 6.05
 (1H, dd, $J_{\text{gem}} = 2.7$ Hz et $J_{\text{trans}} = 17.1$ Hz, H_b), 5.56 (1H, dd, $J_{\text{gem}} = 2.7$ Hz et $J_{\text{cis}} = 9.7$ Hz,

H_a), 3.92 (1H, m, CH), 3.62 (3H, s, CH₃-O), 3.10 (2H, q, J = 6.3 Hz, CH₂-NH), 1.60 (6H, m, CH₂ de la lysine), 1.38 (9H, s, CH₃ du Boc).

RMN ¹³C (62.86 MHz, CDCl₃) : δ 169.3, 161.3 (CO), 136.8 (C^{IV} arom), 130.7 (CH arom.), 128.6 (C^{IV} arom), 128.6 (CH arom.), 125.5 (CH=N(O)), 72.2 (C^{IV}), 28.4 (CH₂-CO), 25.7 (CH₃ du *tert*-butyl).

5

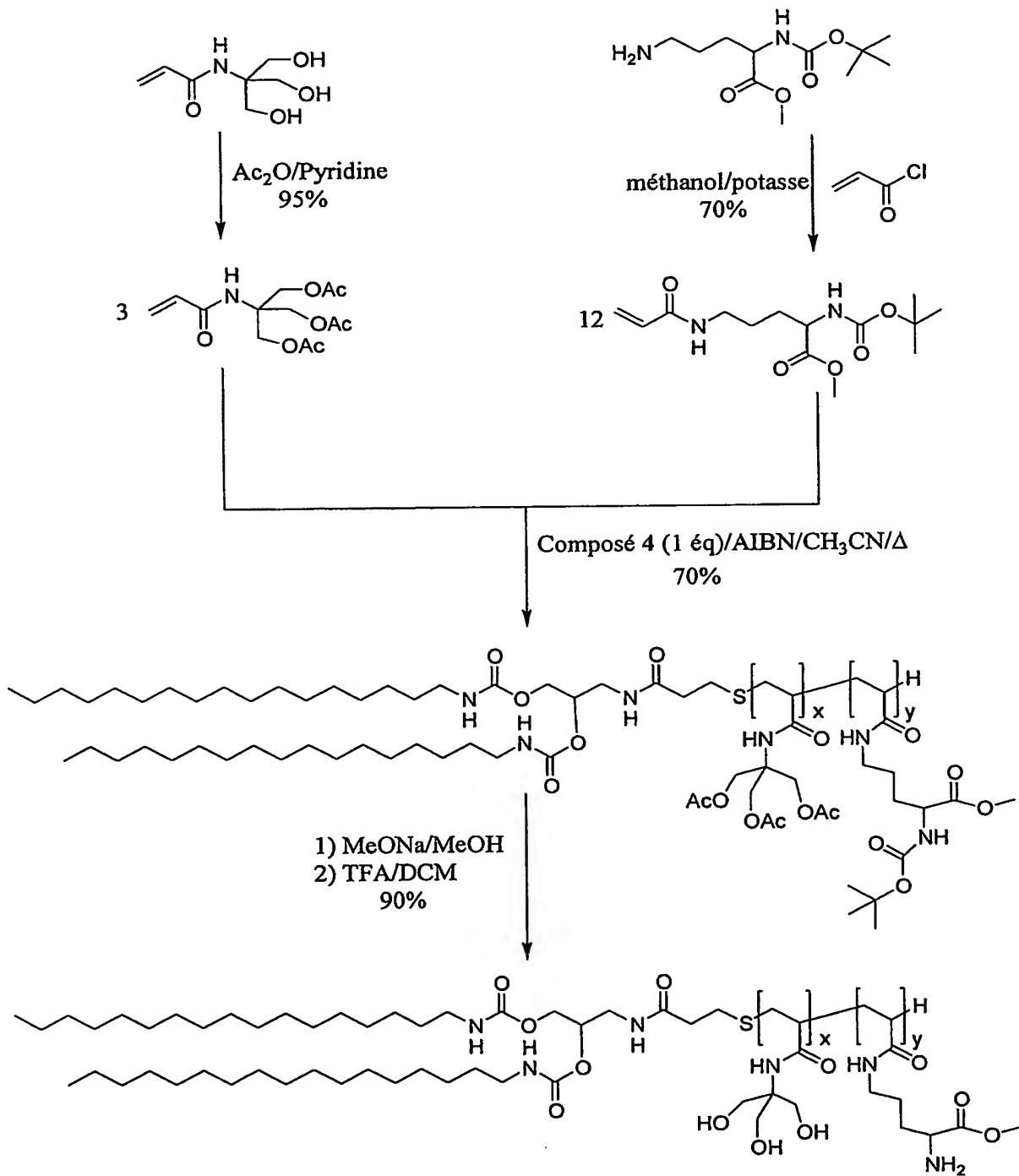


Schéma de synthèse du télomère lipidique de ciblage G

- Synthèse du lipide téломérisé G

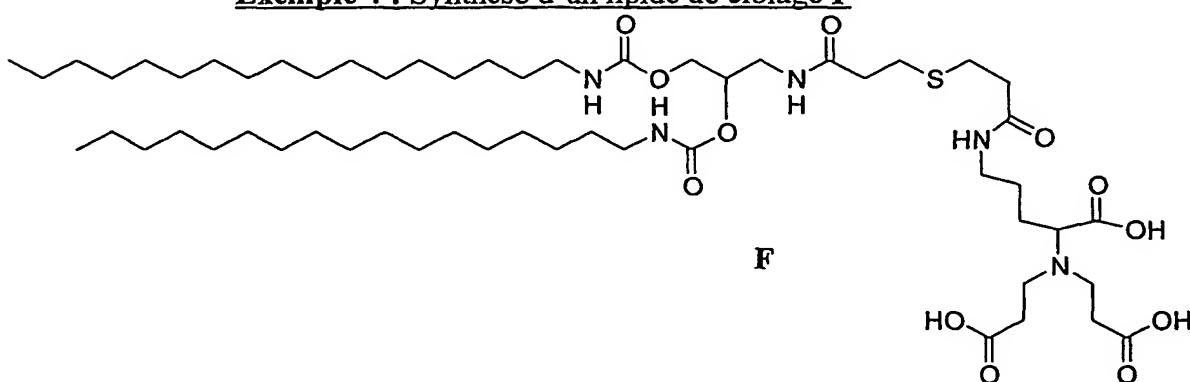
Dans un ballon bicol de 100 mL surmonté d'un réfrigérant, sont dissous 0,767 g de monomère tris-(acétoxyméthyl) acrylamidométhane 6 (2,55 mmoles, 12 éq) et 5 0,2 g de monomère 5 (0,63 mmole, 3 éq) dans 20 mL d'acétonitrile fraîchement distillé. Le tris-(acétoxyméthyl) acrylamidométhane 6 a été préparé conformément à l'enseignement du document A.Polidori et al., New J. Chem., 1994, 18, 839-848. Le milieu réactionnel est dégazé sous argon et porté à reflux. 7 mg d'AIBN ($4,29 \cdot 10^{-2}$ mmole, 0,2 éq) et 0,157 g de thiol 4 (0,21 mmole, 1 éq) dissous dans 5 mL d'acétonitrile fraîchement distillé et dégazé 10 sont additionnés. La réaction est maintenue au reflux pendant 4h jusqu'à consommation totale des monomères (détectée par CCM). Le milieu réactionnel est concentré sous pression réduite et le brut réactionnel est filtré sur colonne sephadex (MeOH/CH₂Cl₂ 1 :1). Le produit est ensuite dissous dans 100 mL de méthanol en présence d'une quantité catalytique de méthylate de sodium. Après 5h d'agitation le milieu réactionnel est 15 neutralisé par addition de résine acide IRC 50. La résine est éliminée par filtration et le solvant éliminé sous pression réduite. Le produit est ensuite mis en réaction à froid dans un mélange acide TFA/CH₂Cl₂ (20%) pendant 3h.

Le milieu réactionnel est concentré sous pression réduite. L'huile obtenue est reprise plusieurs fois dans de l'éther jusqu'à précipitation du téloïmère sous la forme 20 d'une poudre blanche. Le produit est dissous dans l'eau et lyophilisé jusqu'à obtention du composé G sous la forme d'une poudre blanche.

Le degré de polymérisation moyen (DPn) et le rapport des concentration de chaque monomère dans la macromolécule (x et y) a été déterminé par RMN ¹H en comparant les intégrations des signaux des méthyles des deux chaînes alkyle à 1,1 ppm à 25 celle des signaux du Tris (CH₂OH) à 4,3 ppm et de la lysine (CH₂NH) à 3,37 ppm. Nous avons pu déterminer les valeurs suivantes pour x et y :

x : 30 et y : 10

Exemple 4 : Synthèse d'un lipide de ciblage F



2 g de Boc Lysine (8,13 mmoles) sont dissous dans 10mL d'un mélange acétonitrile – soude 2N 1 : 1. Le milieu réactionnel est refroidi à 10°C . Le chlorure d'acryloyle (1,1 g, 12,19 mmoles) dissous dans 10 mL d'acétonitrile est additionné goutte à goutte. Le pH est maintenu à 8 par addition de soude 2N. A la fin de l'addition le milieu réactionnel est agité 2h à température ambiante puis acidifié avec une solution d'HCl 2N, extrait avec de l'acétate d'éthyle (3x20mL). La phase organique est séchée puis concentrée sous pression réduite. Le produit final est obtenu pur sous la forme d'une poudre blanche par recristallisation dans l'éthanol (1,9 g, 78%).

5 RMN ¹H (250 MHz, DMSO-d6) : δ 8.02 (1H, t, NH-CO-O), 7.18 (1H, d, J = 7.4 Hz, NH-CO), 6.25 (1H, dd, J _{cis} = 9.4 Hz et J _{trans} = 17.1 Hz, H_c), 6.05 (1H, dd, J _{gem} = 2.7 Hz et J _{trans} = 17.1 Hz, H_b), 5.6 (1H, dd, J _{gem} = 2.7 Hz et J _{cis} = 9.4 Hz, H_a), 3.92 (1H, m, CH), 3.10 (2H, q, J = 6.3 Hz, CH₂-NH), 1.60 (6H, m, CH₂ de la lysine), 1.38 (9H, s, CH₃ du Boc).

10 RMN ¹³C (62.86 MHz, DMSO-d6) : δ 169.3, 161.3 (CO), 155.8 (CO urethane), 130.7 (CH₂=), 128.6 (-CH=), 80.5 (C tBu), 53.7 (CH Lys), 40.3 (CεLys), 33.2 (CβLys), 29.8 (CδLys), 28.4 (CH₂-CO), 25.7 (CH₃ du *tert*-butyl).

- Acide 6-Acryloylamino-2-[bis-(2-carboxy-éthyl)-amino]-hexanoïque

8

Dans un ballon de 50 mL, 1,9 g de composé 7 (6,33 mmoles) sont dissous dans 20 mL d'un mélange acide trifluoroacétique – dichlorométhane 1 :1. Après 2h d'agitation le solvant est évaporé sous pression réduite et l'huile obtenue est reprise plusieurs fois dans du chloroforme et évaporé jusqu'à obtention d'une poudre. Dans un ballon de 25 mL, 1,94 g d'acide bromoacétique (12,66 mmoles) sont dissous dans 7 mL de soude 2N. La solution est refroidie à 0°C dans un bain de glace et la poudre obtenue après déprotection, dissoute dans 11 mL d'une solution aqueuse de soude 2N est additionnée goutte à goutte. Après 2h de réaction à température ambiante, une solution aqueuse d'HCl 2N est additionnée jusqu'à l'obtention d'un pH acide. Le produit précipite. Le précipité est filtré et essoré puis séché sous pression réduite. Le produit 8 est obtenu pur sous la forme d'une poudre blanche après recristallisation dans l'éthanol (1,6 g, 57%).

20 RMN ¹H (250 MHz, DMSO-d6) : δ 8.02 (1H, t, NH-CO-O), 7.18 (1H, d, J = 7.4 Hz, NH-CO), 6.25 (1H, dd, J _{cis} = 9.4 Hz et J _{trans} = 17.1 Hz, H_c), 6.05 (1H, dd, J _{gem} = 2.7 Hz et J _{trans} = 17.1 Hz, H_b), 5.6 (1H, dd, J _{gem} = 2.7 Hz et J _{cis} = 9.4 Hz, H_a), 3.5 (4H, s, N-CH₂-COOH), 3.3 (1H, t, J=7.1 Hz, CH₂-CH₂-N), 2.9 (2H, m, CH₂NH), 1-1.5 (6H, m, CH₂CH₂CH₂).

25 RMN ¹³C (62.86 MHz, DMSO-d6) : δ 174.8, 173.6 (COOH), 168.4 (CONH), 130.4 (CH₂=), 128.2 (-CH=), 64.8 (CH Lys), 53.8 (N-CH₂-COOH), 40.3 (CεLys), 30.5 (CβLys), 29.8 (CδLys).

- Synthèse du lipide F

2,56 g de composé 4 (3,6 mmol) et 1,6 g de composé 8 (3,6 mmol) sont solubilisés dans 30 mL de triéthylamine fraîchement distillée. Le mélange est porté à 50°C sous bullage d'Argon durant 2 heures puis ramené à température ambiante et évaporé à sec sous pression réduite. Le produit est obtenu pur sous la forme d'une poudre blanche après 5 recristallisation successive dans l'acétate d'éthyle (2,29 g, Rdt : 55 %).

RMN ¹H (250 MHz, DMSO-d6) : δ (ppm) 7.12 (1H, t, NH-CO-O), 6,48 (1H, t, CONHCH₂) ; 6,37 (1H, s, CONHC) ; 5,05-4,96 (3H, m, CHO, CH₂O) ; 4,45 (6H, s, CH₂O) ; 4,22 (2H, m, NH) ; 3,48 (6H, s + t, N-CH₂-COOH, CH₂NH) ; 3,25 (1H, t, J=7.1 Hz, CH₂-CH-N), 3,17 (2H, m, CH₂NH) ; 2,81 (4H, t, CH₂S) ; 1,44 (4H, m, NHCH₂CH₂) ; 10 1,27 (60H, m, CH₂Lys, CH₂ chaînes) ; 0,90 (6H, t, CH₃).

RMN ¹³C(250 MHz, DMSO-d6) : δ (ppm) 171,7-171,5 (COOH, CH₂CONH) ; 156,2-156,0 (OCONH) ; 71,2 (CHO) ; 64,5 (CH Lys), 63,6 (CH₂O) ; 62,5 (CH₂O) ; 53,2 (N-CH₂-COOH), 41,2 (NCH₂CH₂) ; 40,2, 40,1 (CεLys, NHCH₂CH) ; 37,1-15 36,6 (SCH₂CH₂CO) ; 31,9 (CβLys) ; 29,8-29,3 (chaînes et CβLys) ; 26,8 (CH₃) ; 22,6 (CH₂CH₃) ; 20,8 (CH₂S) ; 14,1 (CH₃).

32

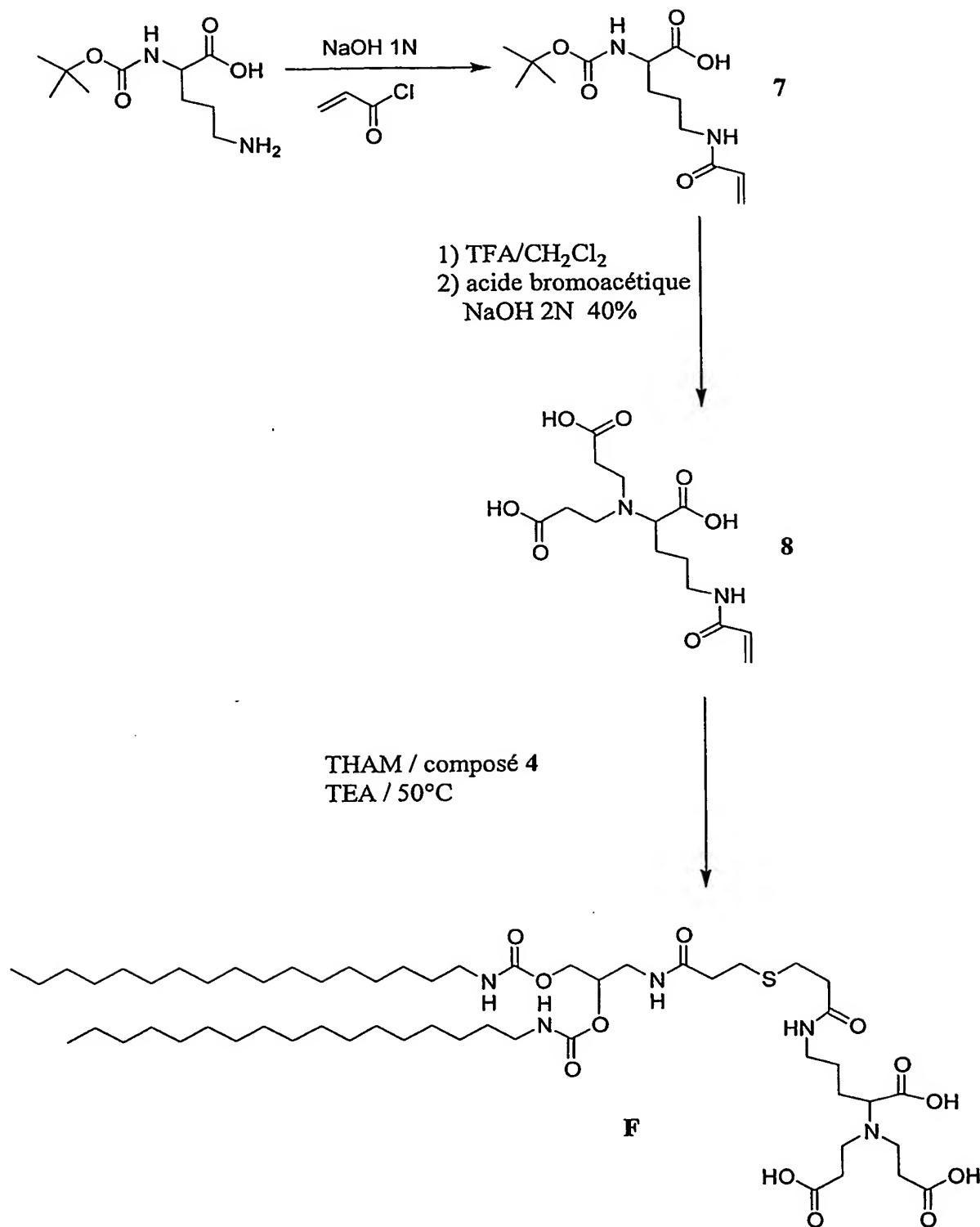


schéma de synthèse du lipide de ciblage F

Exemple 5 : Préparation des vésicules tubulaires à partir du dérivé A1Matériel utilisé.

- Mesure de la taille des vésicules tubulaires.

La distribution en taille des particules a été mesurée par spectroscopie de corrélation photonique de la lumière d'échantillon dilués dans l'eau en utilisant un appareil Malvern HPPS/NIBS équipé d'un laser He/Ne de 3 mW et d'un corrélateur à 288 canaux muni d'une avalanche de photodiodes. Le traitement mathématique de la courbe 5 d'autocorrélation fait appel à la méthode Contin.

- Dispersion des lipides

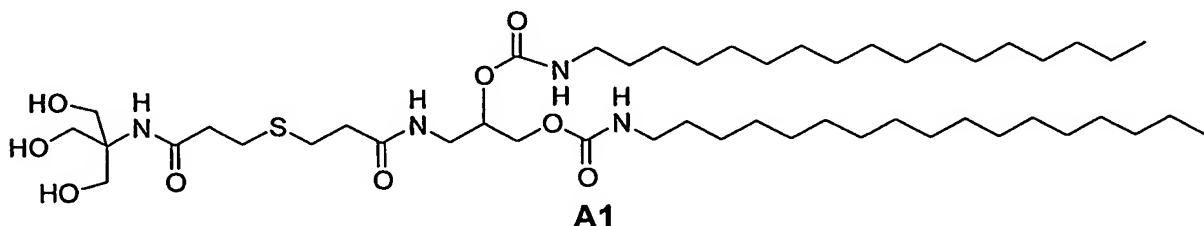
Les lipides A sont dispersés dans l'eau selon la méthode film dans un bain de sonication Bransonic thermostaté type 2510 E (100 W, 42 Hz) au dessus de leur température de transition de phase pendant une demi heure.

10 • Formation des dispersions de vésicules tubulaires

Les vésicules tubulaires sont préparées dans un premier temps en solubilisant le lipide A1 dans le chloroforme. La solution est concentrée lentement sous pression réduite dans un ballon forme cœur de 20 mL à l'aide d'un évaporateur rotatif. Le film obtenu est ensuite séché sous pression réduite à l'aide d'une pompe à palette. Le film 15 de lipide est réhydraté avec de l'eau distillée à 65 °C (10°C au dessus de la température de transition de phase du lipide) à une concentration de 2.5 mg.mL⁻¹. Le mélange est homogénéisé au vortex pendant 5 minutes puis soumis aux ultrasons pendant 30 minutes à 70°C. La solution bleutée translucide obtenue est filtrée à travers un filtre de 0,45 µm puis 20 analysée au spectromètre de corrélation photonique et en microscopie électronique par transmission (figures 3, 4 et 5).

Avec R=C₁₇H₃₅ (dérivé A1). La température de transition de phase a été mesurée par détection de la polarisation d'une sonde fluorescente, le DPH en spectrofluorimétrie : T_m = 54°C

Nous obtenons des vésicules tubulaires dont le diamètre hydrodynamique 25 moyen mesuré par diffraction de la lumière est de 132 nm (IP : 0,35).



Les mesures de forme et de taille établies par observation des clichés de 30 microscopie électronique (figures 4 et 5) ont permis de mettre en évidence la formation de vésicules tubulaires refermées à leurs extrémités dont la section moyenne est de 38 nm et la longueur moyenne de 247 nm. Les analyses en cryofracture ont confirmé la formation de

ces vésicules tubulaires et leurs caractéristiques morphologiques, à savoir la présence d'une cavité aqueuse interne isolée du milieu extérieur.

5 Ces vésicules tubulaires ont une stabilité élevée puisqu'on n'observe aucune évolution de la taille des particules après un an de stockage tandis que dans les mêmes conditions, des liposomes formés de phosphatidyl choline de jaune d'œuf évoluent au bout de seulement 5 jours.

10 La mise en évidence de la cavité interne aqueuse a été prouvée indirectement par des mesures spectrofluorimétriques de l'encapsulation et des cinétiques de libération d'une sonde fluorescente hydrophile, la carboxyfluorescéine (figure 1). Les 15 mesures montrent clairement une cinétique de libération plus lente de la sonde fluorescente comparée à une encapsulation traditionnelle dans un mélange de phosphatidyl choline de jaune d'œuf.

Exemple 6 : Encapsulation de carboxyfluorescéine dans des vésicules tubulaires fabriquées à partir du dérivé A1

20 Le pouvoir d'encapsulation des différents composés est déterminé par spectrofluorimétrie à l'aide d'une sonde fluorescente : la 5 (6)-carboxyfluorescéine. On mesure la libération de ce marqueur fluorescent à partir des vésicules préparées selon les méthodes standardisées.

Cette étude nécessite la préparation d'un tampon Tris (15 mM et 150 mM NaCl) à pH 7,4, ainsi que d'une solution de carboxyfluorescéine à 120 mM et pH 7,4 également.

25 Les composés étudiés sont pesés (2,5 mg/mL) et sont dissous dans un minimum de méthanol. Le solvant est évaporé sous pression réduite au rotavapor et le film ainsi obtenu est séché par un flux d'azote.

On ajoute la solution de carboxyfluorescéine 120 mM dans le tampon Tris de manière à obtenir une dispersion de lipides de concentration égale à 2,5 mg/mL. La suspension obtenue est agitée au vortex pendant 1 minute puis soumise aux ultrasons dans un bain de sonication pendant 1 heure à 70°C.

30 La sonde fluorescente non encapsulée est éliminée par passage sur colonne Séphadex G25 préalablement équilibrée avec le tampon Tris. La fraction de vésicule récoltée est immédiatement étudiée par spectrofluorimétrie.

35 Les mesures de fluorescence ont été réalisées à l'aide d'un spectrofluorimètre Jobin-Yvon (spectrofluoromax 2), équipé d'une lampe Xénon 150 W. Toutes les mesures ont été effectuées dans une cuve en quartz, thermostatée à 25°C. Les échantillons ont été analysés à une longueur d'onde d'excitation de 480 nm, et une longueur d'onde d'émission de 530 nm pendant 4 heures.

Les bandes passantes ont été fixées à 0,5 nm aussi bien pour l'excitation que pour l'émission.

Pour chaque mesure, l'intensité de fluorescence initiale (F_0) est déterminée 30 secondes après la filtration sur colonne. La libération est étudiée sur une période de 4h et l'intensité de fluorescence (F_t) est mesurée à intervalle régulier. L'intensité maximum de fluorescence (F_{max}) qui correspond à 100% de relargage, est obtenue après la lyse des vésicules tubulaires obtenue par ajout de Triton X100 (10% v/v).

Le pourcentage de libération est obtenu à l'aide de l'équation suivante (figure 1) :

$$10 \quad \%R = (F_t - F_0) / F_{max}$$

Exemple 7 : Polymérisation d'un monomère encapsulé dans des vésicules tubulaires obtenues à partir du lipide A1

La composition des solutions utilisées est résumée dans le Tableau 1.

	Désignation	Solvant	Concentration
Monomère	THAM	Eau distillée	0,1 M
	Acrylamide	Eau distillée	0,1 M
Amorceur	tBuOOH / Na ₂ S ₂ O ₅	Dichlorométhane / Tampon	2,5.10 ⁻⁴ M / 2,5.10 ⁻⁴ M
	Na ₂ S ₂ O ₅	Tampon	
Tampon	NaCl	Eau distillée	0,1 M

15 Tableau 1

- Préparation du film

20 mg de lipides A1 sont solubilisés dans 2 mL d'une solution d'hydropéroxyde de Cumène dans le dichlorométhane fraîchement distillé et dégazé par bullage d'argon (2,5.10⁻⁴ M), dans un ballon forme cœur.

20 La solution est évaporée à sec à l'évaporateur rotatif (la température du bain ne dépassant pas 40°C) puis le film est séché à la pompe à palette (1 heure) et placé sous atmosphère inerte jusqu'à utilisation. Dans le cas d'un amorçage par le dithionite de sodium, le film est préparé dans du dichlorométhane fraîchement distillé et dégazé par bullage d'Argon.

25 • Dispersion

2 mL de solution de monomère dans l'eau distillée (0,1 M), préalablement désoxygénée par bullage d'Argon sont ajoutés. Le mélange est agité pendant 1 minute puis placé dans un bain d'ultrasons durant 60 minutes à 70 °C.

30 • Séparation - Polymérisation

La préparation est déposée sur colonne Sephadex G50 (2 cm de diamètre pour une hauteur de 10 cm de gel) préalablement équilibrée avec un tampon NaCl 0,1 M désoxygéné pendant 30 minutes par bullage d'Argon.

5 2 mL de fraction bleutée correspondant à une élution de 25 à 27 mL sont récupérés dans un ballon. 2 mL de solution de méta bisulfite de sodium dans le tampon NaCl ($2,5 \cdot 10^{-4}$ M) sont alors ajoutés pour amorcer la polymérisation qui se déroule sous atmosphère inerte, à 37°C et durant 1 (acrylamide) à 3 heures (THAM).

10 Dans le cas d'un amorçage par le dithionite de sodium, 2 mL d'une solution de l'amorceur dans le tampon NaCl 0,1 M ($2 \cdot 10^{-3}$ M) sont ajoutés après séparation sur colonne Sephadex.

Exemple 8 : Télomérisation d'un monomère encapsulé dans des vésicules tubulaires obtenues à partir du lipide A1

La composition des solutions utilisées est résumée dans le tableau 2.

	Désignation	Solvant	Concentration
Monomère	THAM	Eau distillée	0,1 M
Agent télogène	3-mercaptopropanoate de cholestéryle	Dichlorométhane	$2 \cdot 10^{-3}$ M
Amorceur	tBuOOH / $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$	Dichlorométhane / Tampon	$2,5 \cdot 10^{-4}$ M / $2,5 \cdot 10^{-4}$ M
	$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$	Tampon	
Tampon	NaCl	Eau distillée	0,1 M

Tableau 2

15 • Préparation du film

18 mg de lipide A1 et 2 mg de composé télogène D sont solubilisés dans 2 mL d'une solution d'hydropéroxyde de Cumène dans le dichlorométhane fraîchement distillé et dégazé par bullage d'Argon ($2,5 \cdot 10^{-4}$ M), dans un ballon cœur.

20 La solution est évaporée à sec à l'évaporateur rotatif (la température du bain ne dépassant pas 40°C) puis le film est séché à la pompe à palette (1 heure) et placé sous atmosphère inerte jusqu'à utilisation. Dans le cas d'un amorçage par le dithionite de sodium, le film est préparé dans du dichlorométhane fraîchement distillé et dégazé par bullage d'Argon.

- Dispersion

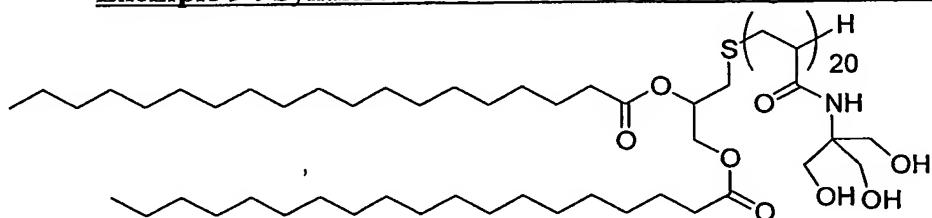
25 2 mL de solution de monomère dans l'eau distillée (0,1 M), préalablement désoxygénés par bullage d'Argon sont ajoutés. Le mélange est agité 1 minute puis placé dans un bain d'ultrasons durant 60 minutes à 70°C.

- Séparation - Polymérisation

La préparation est déposée sur colonne Sephadex G50 (2 cm de diamètre pour une hauteur de 10 cm de gel) préalablement équilibrée avec un tampon NaCl 0,1 M désoxygéné 30 minutes par bullage d'Argon.

5 2 mL de fraction bleutée correspondant à une élution de 25 à 27 mL sont récupérés dans un ballon. 2 mL de solution de métabisulfite de sodium dans le tampon NaCl ($2,5 \cdot 10^{-4}$ M) sont alors ajoutés pour amorcer la télomérisation qui se déroule sous atmosphère inerte, à 37°C et durant 16 à 20 heures. Dans le cas d'un amorçage par le dithionite de sodium, 2 mL d'une solution de l'amorceur dans le tampon NaCl 0,1 M ($2 \cdot 10^{-3}$ M) sont ajoutés après séparation sur colonne Sephadex.

10 **Exemple 9 : Synthèse d'un tensioactif de formule générale (IB)**



Composé TE 17-20

- rac 3-(*tritylmercaptopropane-1,2-diol*) (Composé 10)

15 10 g (92,6 mmol) de 3-mercaptopropane diol et 13,54 mL (97,23 mmol, 1,05 équ.) de Triéthylamine (TEA) sont solubilisés dans 100 mL de THF. 27,07 g (97,23 mmol, 1,05 équ.) de chlorure de triphénylméthyle dissous dans 10 mL de THF sont additionnés goutte à goutte au mélange à une température inférieure à 30 °C. A la fin de l'addition, le milieu réactionnel est laissé sous agitation, à froid, en maintenant le pH à 8-9 par ajout de TEA. L'excès de chlorure de triphénylméthyle est éliminé par ajout d'une solution de NaHCO₃ saturée avant d'évaporer le THF sous pression réduite. Le produit brut est repris dans CH₂Cl₂ avant d'être lavé avec une solution normale de HCl puis de NaHCO₃ et d'être séché sur Na₂SO₄. Le produit est finalement purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice éluée en gradient (cyclohexane/AcOEt 7 :3 à 20 1 :1). 28,8 g de produit pur sont obtenus sous forme de poudre blanche. R_f_{produit} : 0,4 (CCM – AcOEt/cyclohexane 7 :3). Rendement : 89%. Pf : 97-98 °C

25 RMN ¹H(CDCl₃) : δ (ppm) 7,42-7,27 (m, 15H, aromatiques du trityle) ; 3,50 (m, 3H, CHOH, CH₂OH) ; 2,80 (m, 1H, OH) ; 2,50 (t, 3H, OH, CH₂S)

30 RMN ¹³C(CDCl₃) : δ (ppm) 144,6 (SCC phényl x3) ; 129,6 (C_{para} phényl x3) ; 128,0 (C_{ortho} phényl x6) ; 126,8 (C_{méta} phényl x6) ; 70,6 (CHOH) ; 67,0 (SCPh₃) ; 65,5 (CH₂OH) ; 35,4 (CH₂S)

• rac 3-(*tritylmercapto*)propane-1,2-diyl diheptadécanoate (**composé**

11)

5 0,5 g (1,43 mmol) de **Composé 10** et 0,523 g (4,28 mmol, 3 équ.) de Diméthyl aminiptridine (DMAP) sont solubilisés dans 10 mL de CH₂Cl₂ et refroidis par un bain de glace. 0,952 g (3,14 mmol, 2,2 équ.) de chlorure de stéaroyle solubilisé dans 5 mL de CH₂Cl₂ est alors ajouté goutte à goutte par l'intermédiaire d'une ampoule à brome. Le milieu réactionnel est laissé sous agitation 2 heures après la fin de l'addition. Les sels de DMAP formés sont éliminés par filtration puis le brut réactionnel est évaporé à sec et 10 finalement repris dans un mélange MeOH/Et₂O dans lequel le produit cristallise. 1,07 g de produit pur sont obtenus sous forme d'une poudre blanche. R_f_{produit} : 0,3 (CCM – AcOEt/cyclohexane 7 :3). Rendement : 85 %. Pf : 52-53 °C

15 RMN ¹H (CDCl₃) : δ (ppm) 7,30-7,15 (m, 15H, aromatiques du trityle) ; 5,16 (quint., 1/3H, CHO) ; 4,78 (quint., 2/3H, CHO) ; 4,1 (dddd, 2H, CH₂O) ; 3,10 (t, 2/3H, CH₂S) ; 2,48 (t, 4/3H, CH₂S) ; 2,21 (m, 4H, CH₂CO x2) ; 1,30 (m, 60H, (CH₂)₁₅) ; 0,88 (t, 6H, CH₃)

20 RMN ¹³C(/CDCl₃) : δ (ppm) 172,2 (OCOCH₂ x2) ; 144,4 (SCC phényl x3) ; 129,7 (C_{para} phényl x3) ; 128,2 (C_{ortho} phényl x6) ; 127,1 (C_{méta} phényl x6) ; 70,2 (CHO) ; 67,4 (SCPh₃) ; 64,1 (CH₂O) ; 34,2 (CH₂COO x2) ; 32,6 (CH₂S) ; 29,5 ((CH₂)_n x2) ; 24,9 (CH₂CH₂COO x2) ; 22,7 (CH₂CH₃ x2) ; 14,1 (CH₃ x2)

• rac 3-Mercaptopropane-1,2-diyl diheptadécanoate (**Composé 12**)

A partir de 0,5 g (0,56 mmol) de **composé 11**, et 0,066 g (0,56 mmol, 1 équ.) de triéthylsilane, après ajout d'une solution à 5 % en TFA dans le CH₂Cl₂ et 25 lavages usuels, le brut est évaporé à sec et purifié par cristallisation dans un mélange Et₂O/MeOH. 0,326 g de produit pur est ainsi récupéré sous forme d'une poudre blanche. R_f_{produit} : 0,5 (CCM - acétate d'éthyle/cyclohexane 7:3). Rendement : 90 %.

Pf : 49-51 °C.

30 RMN ¹H(/CDCl₃) : δ (ppm) 5,1 (m, 1H, CHO) ; 4,31 (ddd, 2H, CH₂O) ; 3,10 (t, 2/3H, CH₂S) ; 2,73 (t, 4/3H, CH₂S) ; 2,30 (m, 4H, CH₂CO x2) ; 1,47 (SH) ; 1,25 (m, 60H, (CH₂)₁₅ x2) ; 0,88 (t, 6H, CH₃ x2)

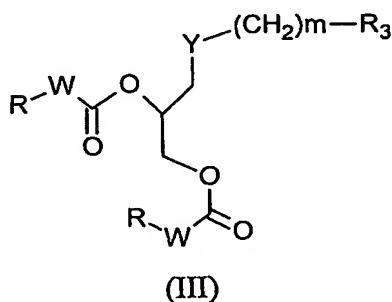
35 RMN ¹³C(/CDCl₃) : δ (ppm) 172,5 (CH₂O₂, CHOCO) ; 71,8 (CHO) ; 62,4 (CH₂O) ; 34,2 (CH₂COO x2) ; 32,4 (CH₂SH) ; 29,5 ((CH₂)_n x2) ; 24,9 (CH₂CH₂COO x2) ; 22,7 (CH₂CH₃ x2) ; 14,1 (CH₃ x2)

1,09 g (6,25 mmol, 5 équ.) de Tris(hydroxymethyl)acrylamidomethane est solubilisé dans 15 mL de MeOH fraîchement distillé. Le mélange est placé sous agitation et barbotage d'argon puis mis en chauffe. Dès ébullition, une solution contenant 0,04 g (0,25 mmol, 0,2 équ.) d'AIBN et 0,8 g (1,25 mmol) de Composé 12 dans un minimum de THF fraîchement distillé (approximativement 1 mL) et préalablement dégazée par un flux d'argon est injectée. La réaction est suivie par chromatographie sur couche mince avec la disparition du thiol (AcOEt/cyclohexane 7:3). Après retour à température ambiante, le brut réactionnel est plongé dans de l'Et₂O froid sous vive agitation où le téломère précipite. 1,2 g de produit est obtenu sous forme de poudre blanche. Rendement : 70 %

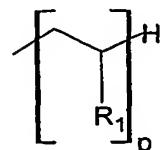
RMN ¹H(/DMSO) : δ (ppm) 7,23 (m, 19,8H, NH xDPN) ; 4,78 (m, 60H, OH x3xDPn) ; 0,86 (m, 6H, CH₃ x2)
DPn : 20

REVENDICATIONS

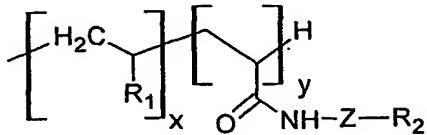
1. Composé de formule (III) :



5

dans laquelle R₃ représente un groupement choisi parmi :

et



10

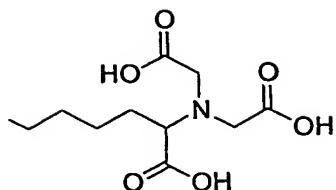
- Y représente un atome de soufre ou un groupement -NH-CO-(CH₂)_n-X, X représente un atome de soufre S ou un groupement -CH₂- ; n est un entier allant de 0 à 10 ;

15 - R représente un groupement choisi parmi : les radicaux hydrocarbonés en C₄-C₂₄ ; les radicaux hydrocarbonés fluorés en C₄-C₂₄ ; les radicaux thioalkyls en C₄-C₂₄ ;

20 - m est un entier allant de 0 à 9 et lorsque X=CH₂ alors 0<m+n<6 ;
 - x représente 0 ou un entier allant de 1 à 30 ;
 - y représente 0 ou un entier allant de 1 à 10 ;
 - R₁ représente un groupement hydrophile ;
 - R₂ représente un groupement de reconnaissance ayant une affinité pour une cible biologique ;

25 - Z est un bras espaceur ; Z est lié à R₂ au moyen d'une liaison qui peut être choisie parmi les fonctions -O-CO-, -CO-NH-, -NH-CO-NH-, -NH-CO-O-, O-CO-O-, -O-, -CH=N-, -S- ou par complexation d'un atome de nickel ; Z est choisi parmi une chaîne peptidique, un acide Ω -aminé, l'éthanolamine, la 3-propanolamine, une diamine de formule -NH-(CH₂)_p-NH- dans laquelle p représente un entier allant de 2 à 6, ou -Z-R₂ représente un groupement NTA de formule suivante :

41

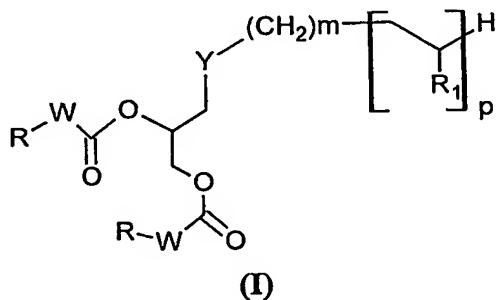


2. Composé selon la revendication 1, caractérisé en ce que le groupement R est choisi parmi les radicaux suivants :

- 5 - le radical thiooctyl
- le n-butyle, le ter-butyle, l'isobutyle, le n-pentyle, l'isopentyle, le n-hexyle, le n-heptyle, le n-octyle, le n-nonyl, le n-décyle, le n-undécyle, le n-dodécyle, le n-tridécyle, le n-tétradécyle, le n-pentadécyle, le n-hexadécyl, le n-heptadécyle, le n-octadécyle, le radical phytyl ($\text{CH}_3[\text{CH}(\text{CH}_3)(\text{CH}_2)_3]_3\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_2$),
- 10 - les radicaux hydrocarbonés fluorés répondant à la formule $-(\text{CH}_2)_r-(\text{CF}_2)_t\text{F}$, dans laquelle r et t représentent deux entiers avec : $14 \geq r+t \geq 4$.

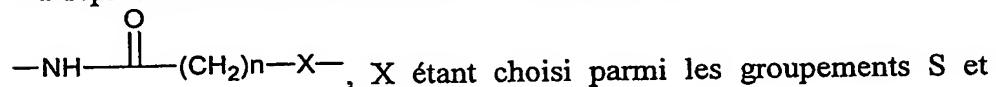
3. Composé selon l'une quelconque des revendications 1 et 2, répondant à la formule (I) :

15



dans laquelle :

- 20 • Y représente un atome de soufre ou un groupement



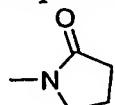
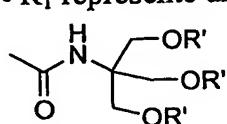
CH_2 , n est un entier allant de 0 à 10 ;

- m est un entier allant de 0 à 9 ; et lorsque $\text{X}=\text{CH}_2$ alors $0 < m+n < 6$

- W représente un groupement $-\text{NH}-$ ou un groupement $-\text{CH}_2-$

- p représente un entier allant de 1 à 50

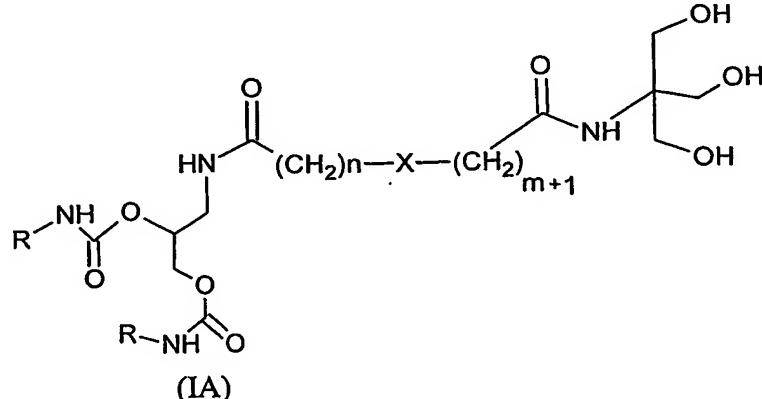
- R_1 représente un groupement choisi parmi les radicaux suivants :



dans lesquels R' représente H ou un groupement hydrophile ;

- R représente un groupement choisi parmi : les radicaux hydrocarbonés en C₄-C₂₄ ; les radicaux hydrocarbonés fluorés en C₄-C₂₄ ; les radicaux thioalkyls en C₄-C₂₄.

5 4. Composé selon la revendication 3, caractérisé en ce qu'il répond à la
formule (IA) : OUI

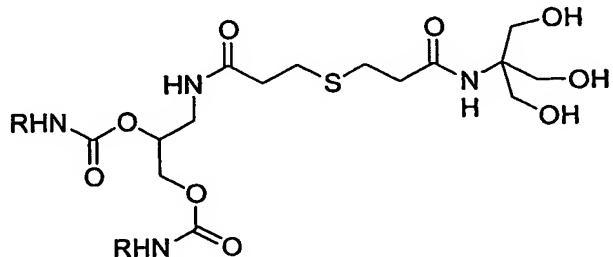


dans laquelle :

- 10 - X représente un atome de soufre S ou un groupement $-\text{CH}_2-$;
- n est un entier allant de 0 à 10 ;
- m est un entier allant de 0 à 9 ;
- lorsque $\text{X}=\text{CH}_2$ alors $0 < \text{m+n} < 6$;
- R représente un groupement choisi parmi : les radicaux hydrocarbonés
15 en $\text{C}_4\text{-C}_{24}$; les radicaux hydrocarbonés fluorés en $\text{C}_4\text{-C}_{24}$; les radicaux thioalkyls en $\text{C}_4\text{-C}_{24}$.

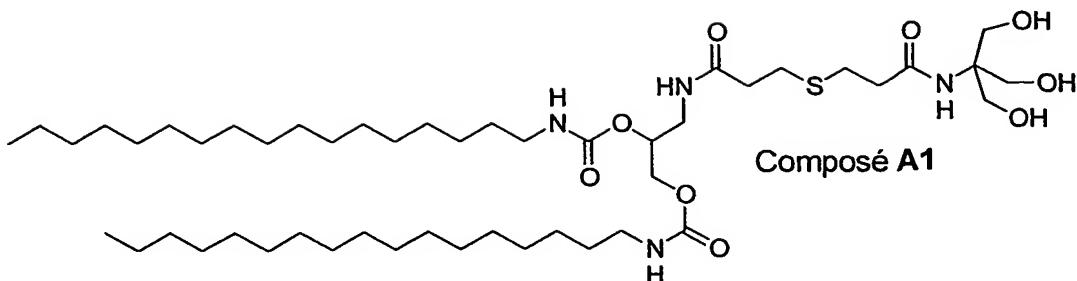
5. Composé selon la revendication 4, caractérisé en ce que R est choisi de façon à ce que (IA) ait une température de transition de phase supérieure à 37°C.

6. Composé selon la revendication 4 ou la revendication 5, caractérisé en
20 ce qu'il répond à la formule A :

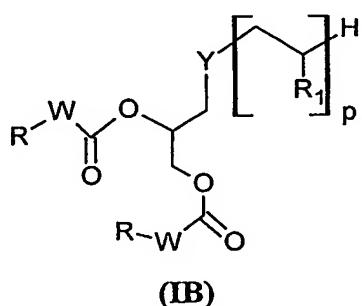


Formule A

25 7. Composé selon la revendication 6, caractérisé en ce qu'il répond à la
formule A1 :



8. Composé selon la revendication 3 répondant à la formule (IB) :



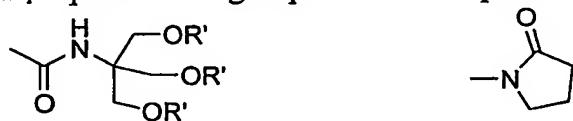
dans laquelle :

Y représente un atome de soufre ou le groupement $-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{S}-$

10 W représente un groupement $-\text{NH}-$ ou un groupement $-\text{CH}_2-$

p représente un entier allant de 1 à 50

R₁ représente un groupement choisi parmi les radicaux suivants :



15 dans lesquels R' représente H ou un composé hydrocarboné polyhydroxylé en C₄-C₂₄ ;

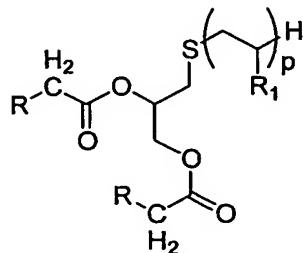
R représente un groupement choisi parmi : les radicaux hydrocarbonés en C₄-C₂₄ ; les radicaux hydrocarbonés fluorés en C₄-C₂₄ ; les radicaux thioalkyls en C₄-C₂₄.

9. Composé selon la revendication 8, caractérisé en ce que R est choisi de façon à ce que (IB) ait une Concentration Micellaire Critique inférieure à 10⁻⁵M.

20 10. Composé selon la revendication 8 ou la revendication 9, caractérisé en ce qu'il vérifie une ou plusieurs des conditions ci-dessous :

- p représente un entier allant de 1 à 5 ;
- Y représente S.

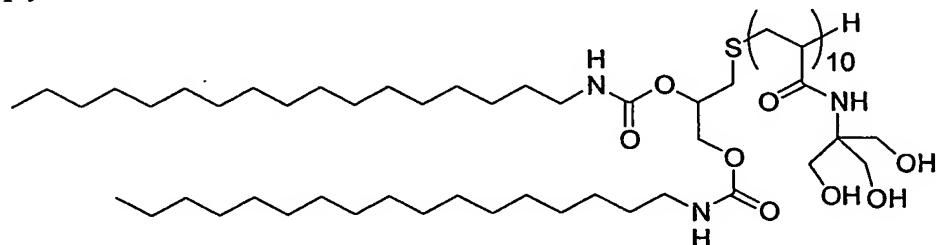
11. Composé selon l'une quelconque des revendications 8 à 10, caractérisé en ce qu'il répond à la formule C dans laquelle p représente un entier allant de 5 à 15 :



5

Composé C

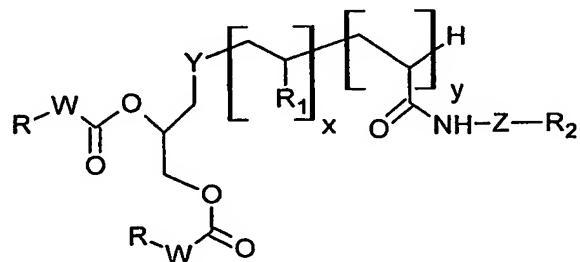
12. Composé selon la revendication 11, caractérisé en ce qu'il répond à la formule C1 :



10

Composé C1

13. Composé selon la revendication 1 ou la revendication 2, caractérisé en ce qu'il répond à la formule (II) :



15

(II)

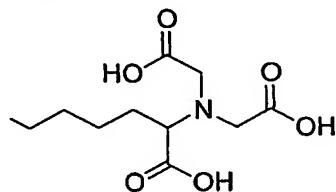
dans laquelle :

- Y représente un atome de soufre ou le groupement $-\text{NH}-\text{CO}-(\text{CH}_2)_n-\text{X}$;
- 20 dans lequel X représente un atome de soufre S ou un groupement $-\text{CH}_2-$, n est un entier allant de 0 à 10 ;
- W représente un groupement $-\text{NH}-$ ou $-\text{CH}_2-$
- x représente 0 ou un nombre entier allant de 1 à 30 ;

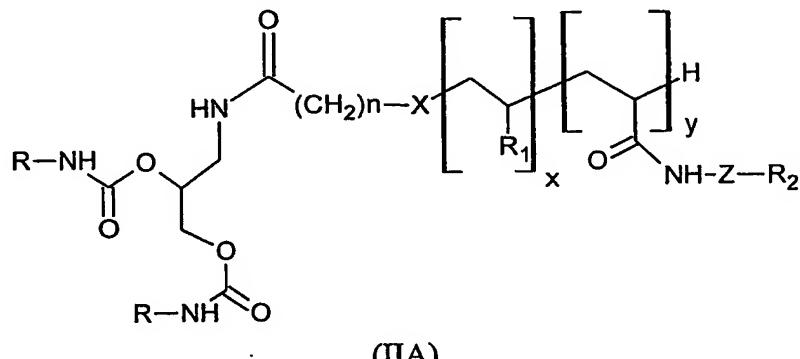
- y représente 0 ou un nombre entier allant de 1 à 10 ;
 - R_1 représente un groupement hydrophile ;
 - R_2 représente un groupement de reconnaissance ayant une affinité pour une cible biologique ;

5 - Z est un bras espaceur ; Z est lié à R_2 au moyen d'une liaison qui peut être choisie parmi les fonctions $-O-CO-$, $-CO-NH-$, $-NH-CO-NH-$, $-NH-CO-O-$, $O-CO-O-$, $-O-$, $-CH=N-$, $-S-$ ou par complexation d'un atome de nickel ; Z est choisi parmi une chaîne peptidique, un acide Ω -aminé, l'éthanolamine, la 3-propanolamine, une diamine de formule $-NH-(CH_2)_p-NH-$ dans laquelle p représente un entier allant de 2 à 6, ou $-Z-R_2$

10 R_2 représente un groupement NTA de formule :



14. Composé selon la revendication 13, caractérisé en ce qu'il répond à la formule (IIA) :



15 15. Composé selon la revendication 14, caractérisé en ce que l'une ou plusieurs des conditions suivantes sont vérifiées :

20 - $X=S$
 - $n=2$
 - R_1 est choisi parmi les radicaux suivants :



dans lesquels R' représente H ou un composé hydrocarboné polyhydroxylé en C₄-C₂₄,

- R est choisi parmi les radicaux suivants :

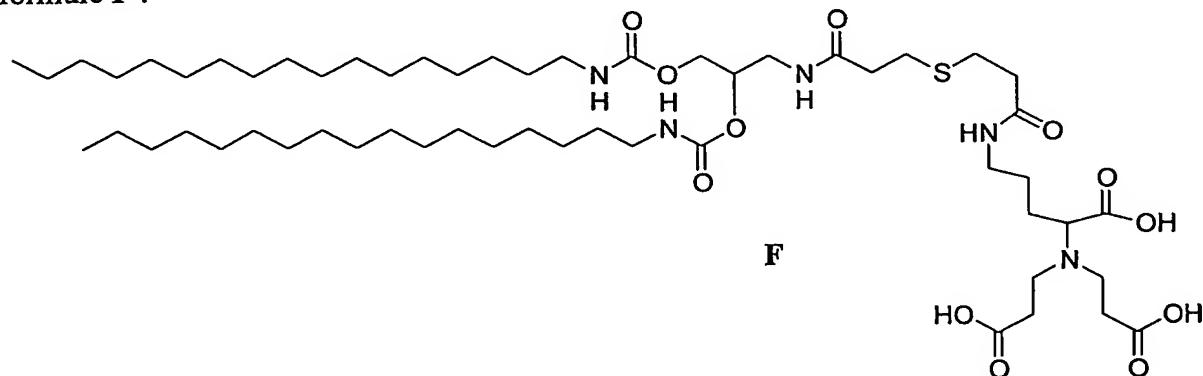
25 - le radical thiooctyl,

- le n-butyle, le ter-butyle, l'isobutyle, le n-pentyle, l'isopentyle, le n-hexyle, le n-heptyle, le n-octyle, le n-nonyle, le n-décyle, le n-undécyle, le n-dodécyle, le n-tridécyle, le n-tétradécyle, radical phytyl ($\text{CH}_3[\text{CH}(\text{CH}_3)(\text{CH}_2)_3]_3\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_2$),

5 - les radicaux hydrocarbonés fluorés répondant à la formule – $(\text{CH}_2)_{\text{r}}-(\text{CF}_2)_{\text{t}}\text{F}$, dans laquelle r et t représentent deux entiers avec : $14 \geq \text{r}+\text{t} \geq 4$.

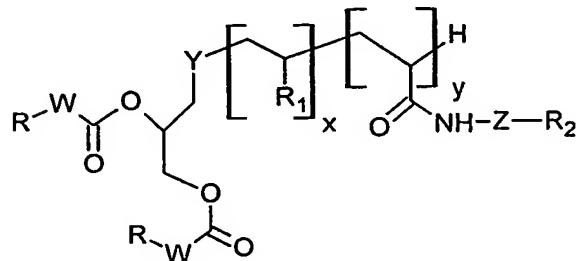
- R_2 est choisi parmi des anticorps, des fragments d'anticorps, des petites molécules effectrices permettant l'interaction avec des récepteurs de surface cellulaires, des antigènes, des sucres, des peptides.

10 16. Composé selon la revendication 15, caractérisé en ce qu'il répond à la formule F :



Formule F

17. Composé selon la revendication 13, caractérisé en ce qu'il répond à la 15 formule (IIB) :



(IIB)

dans laquelle :

20 - Y représente un atome de soufre ou le groupement $-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{S}-$

18. Nanoparticule caractérisée en ce qu'elle comporte un ou plusieurs composés de formule (I) selon l'une quelconque des revendications 3 à 12 comme constituant de ses parois.

19. Nanoparticule selon la revendication 18, caractérisé en ce qu'il comporte en outre de 1 à 5% d'un ou plusieurs composés de formule (II) selon l'une quelconque des revendications 13 à 17.

5 20. Nanoparticule selon l'une quelconque des revendications 18 et 19, caractérisé en ce qu'il comporte en outre un télomère ou polymère d'un monomère de type acrylique contenu dans sa cavité aqueuse interne.

21. Association d'une nanoparticule selon l'une quelconque des revendications 18 à 20 avec un composé choisi parmi : les principes actifs thérapeutiques, les substances cosmétiques, les agents de diagnostic, les vaccins.

10 22. Composition thérapeutique, de diagnostic, vaccinale ou cosmétique comprenant au moins un principe actif en association avec un liposome selon l'une quelconque des revendications 18 à 20.

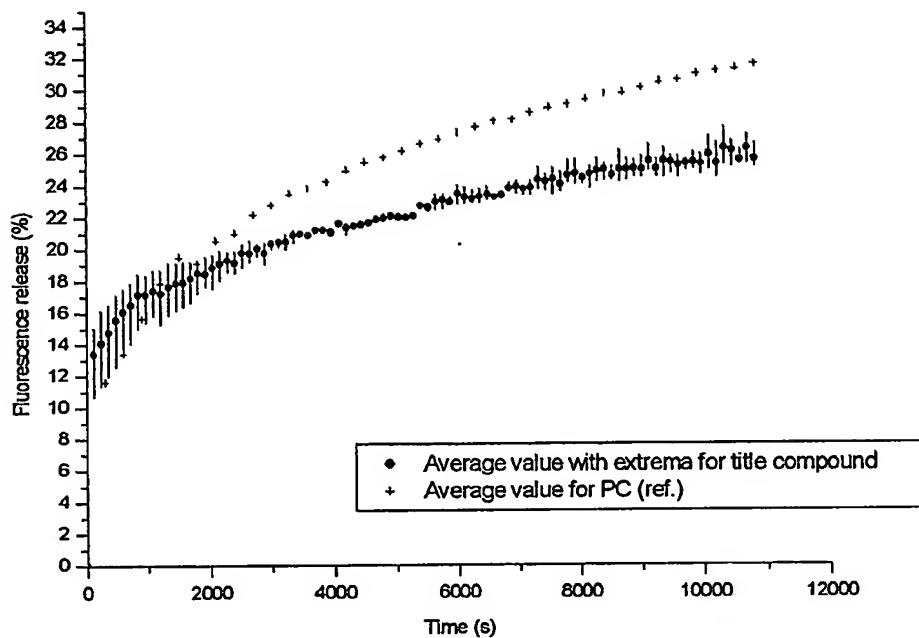


Figure 1 : cinétique de relargage de la carboxyfluorescéine encapsulées dans des liposomes de phosphatidyl choline (+) et des nanotubes constitués du composé A1 (●) mesurée en spectrofluorimétrie.

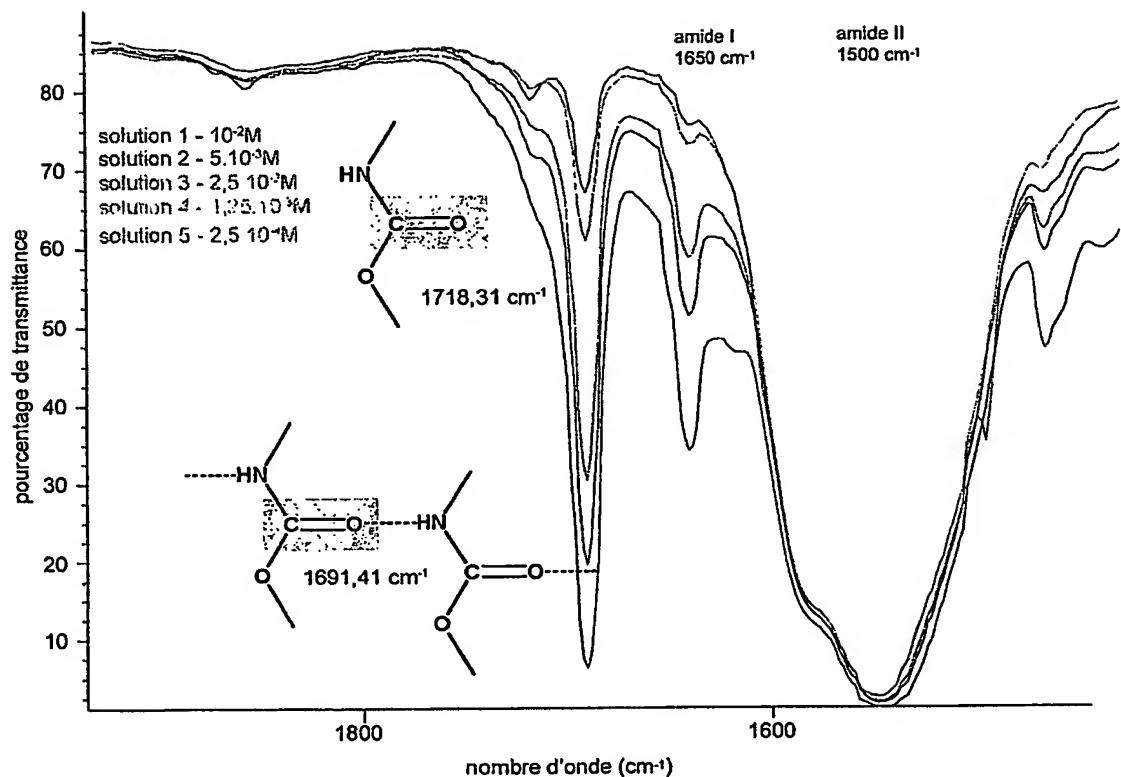


Figure 2 : spectre infra rouge en phase liquide d'une solution du composé A1 dans CCl₄ à différentes concentrations (1.10⁻² à 2,5.10⁻⁴M)

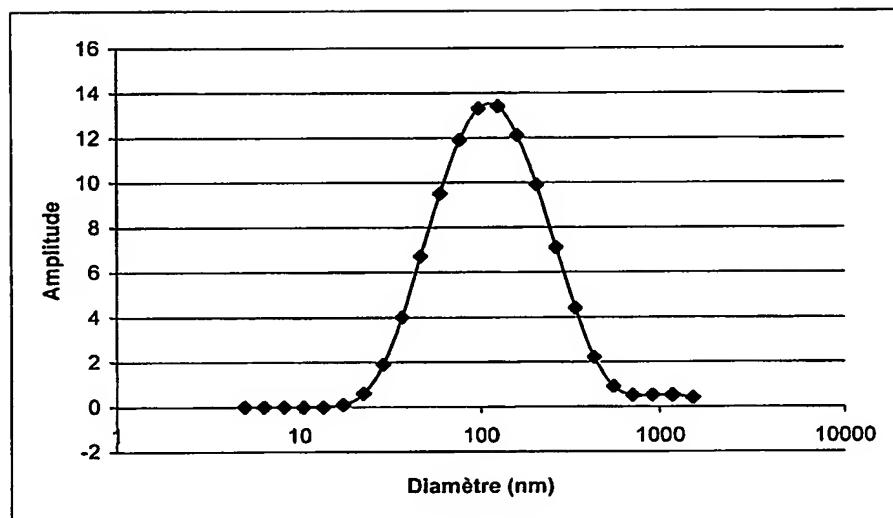


Figure 3 : courbe de distribution en taille par volume

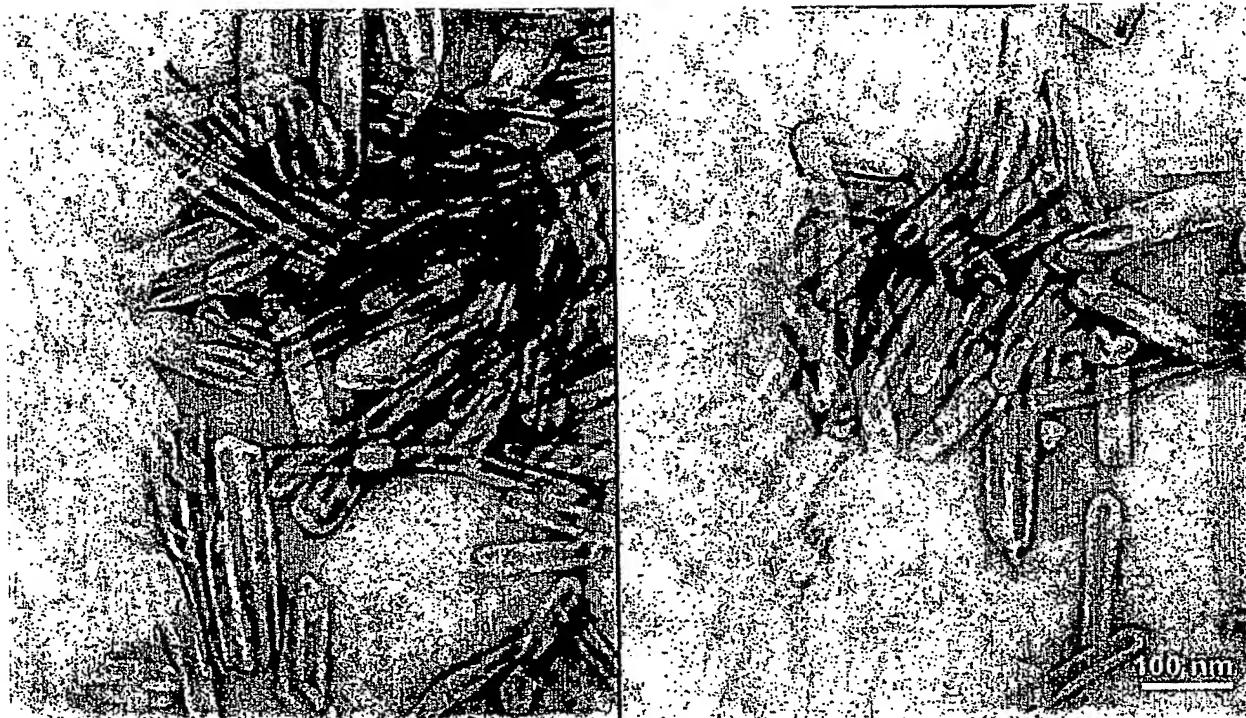


Figure 4 : Microscopie électronique par transmission de phase après coloration négative à l'acétate d'uranyl 2% de nanotubes formés par dispersion du composé A1 ($2,5 \text{ mg.ml}^{-1}$) dans l'eau

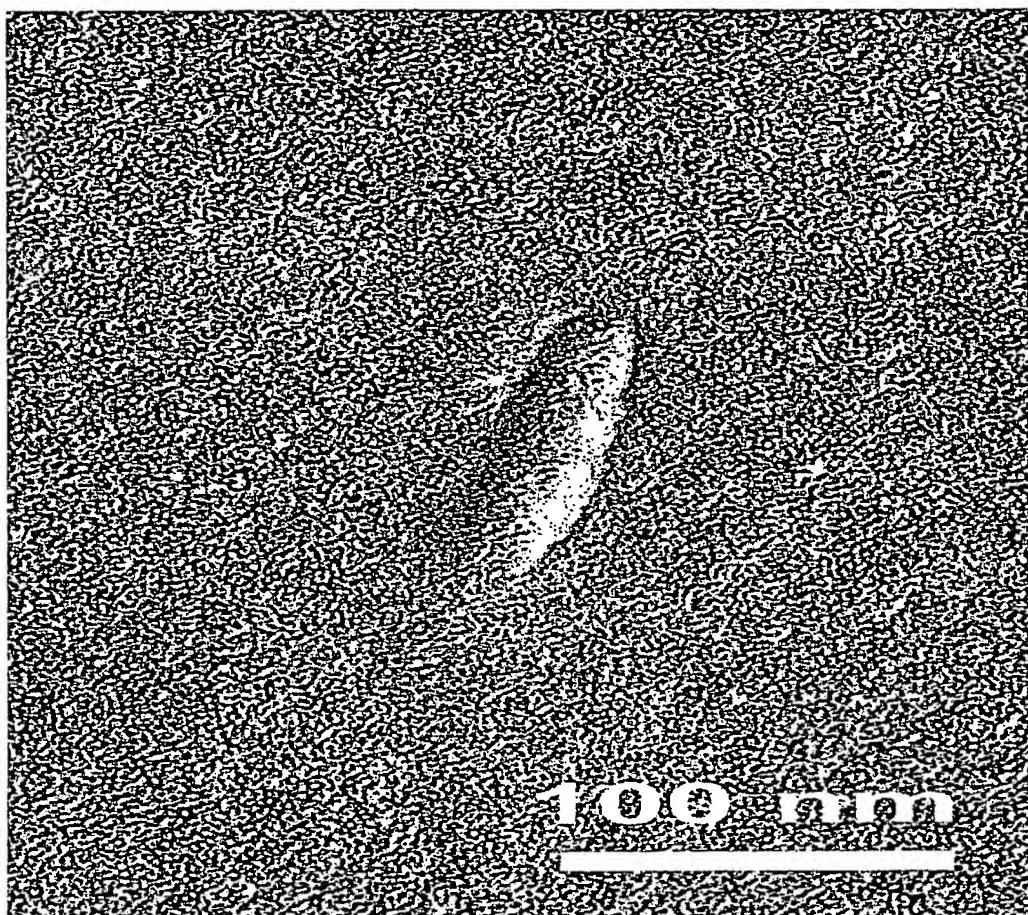


Figure 5 : Microscopie électronique par transmission de phase après cryofracture d'un échantillon de nanotubes formés par dispersion du composé A1 ($2,5 \text{ mg.ml}^{-1}$) dans l'eau

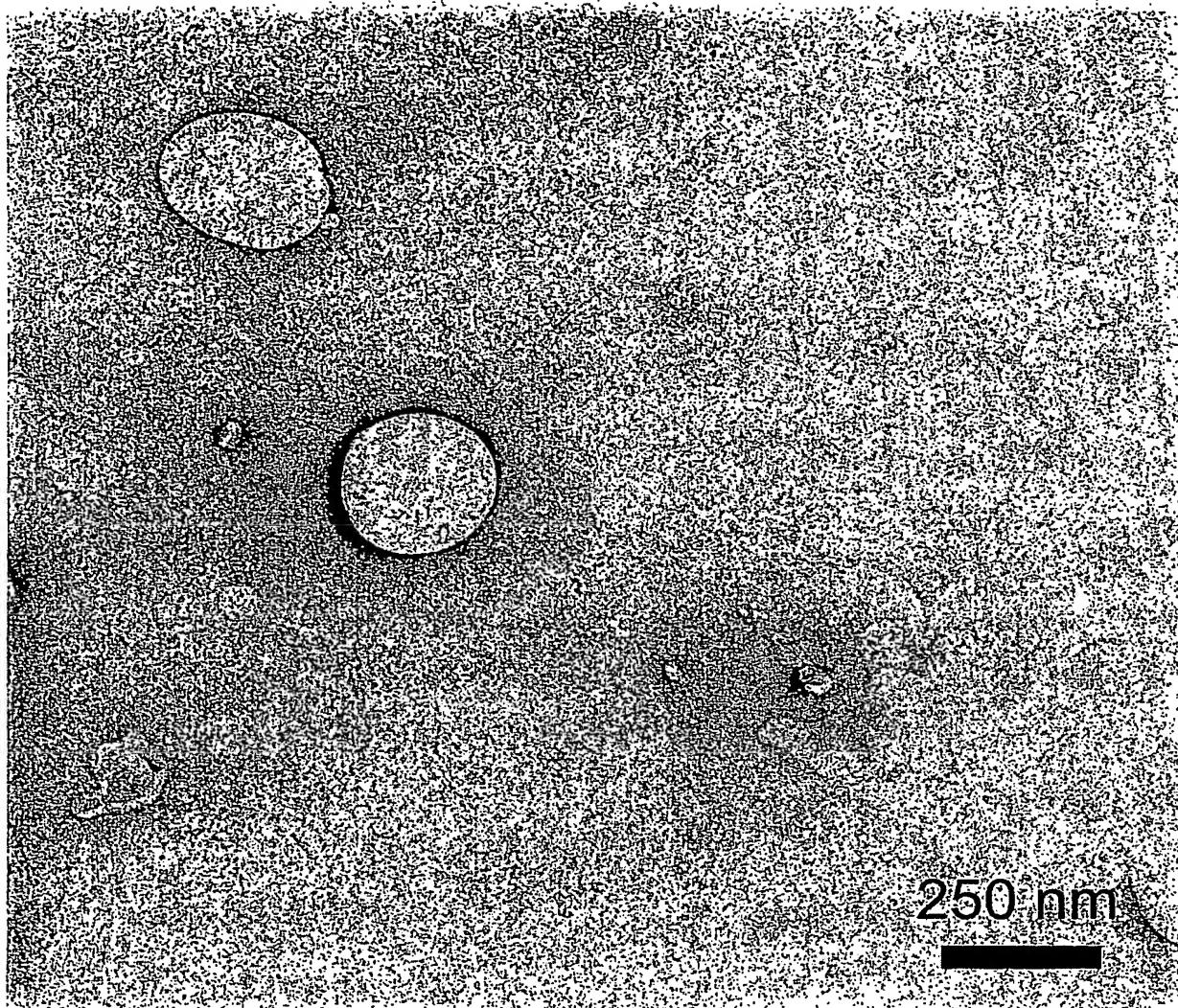


Figure 6 : Microscopie électronique par transmission de phase après coloration négative à l'acétate d'uranyle 2% d'un échantillon de nanotubes formés par dispersion du composé de structure B ($2,5 \text{ mg.ml}^{-1}$) dans l'eau

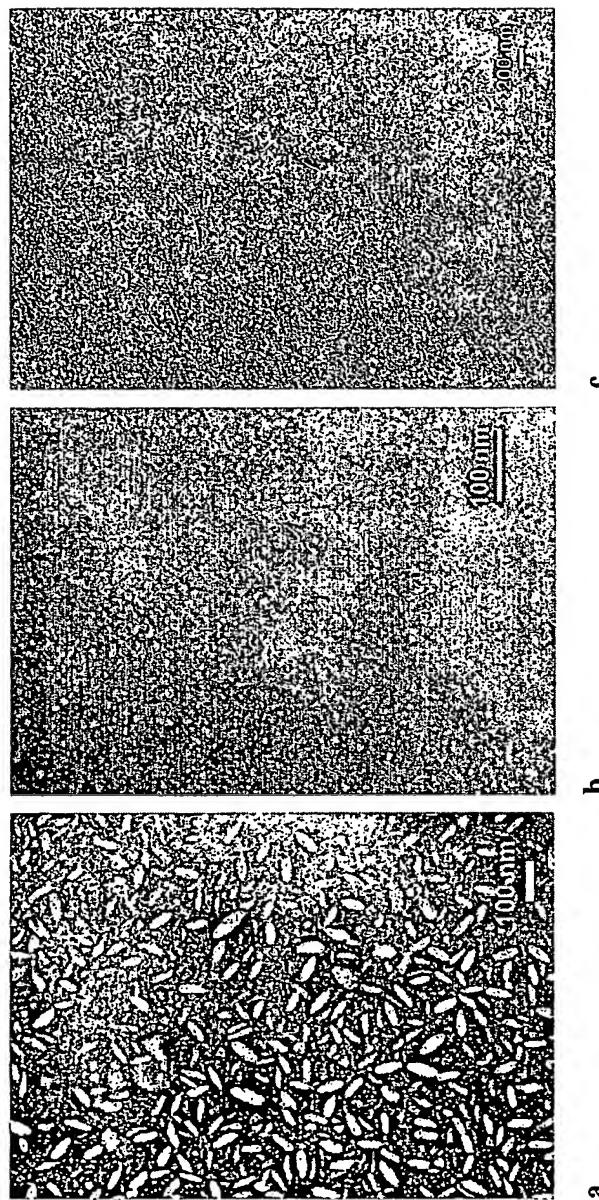


FIGURE 7

Composés A R=C ₁₇ H ₃₅	Diamètre hydrodynamique D_H (nm)	Indice de polydispersité	CMC (mM)	γ_{CMC} (mN.m ⁻¹)	Aire de la tête polaire A (Å ²)
p=5	148 ± 12	0,21	n.d.*	n.d.*	n.d.*
p=8	123 ± 4	0,28	1,14.10 ⁻¹	49,5	66,5
p=11	55 ± 5	0,37	8,71.10 ⁻²	47,4	74,8
p=15	36 ± 2	0,30	6,88.10 ⁻²	54,5	82,3
p=25	8 ± 1	0,37	8,43.10 ⁻²	57,7	85,5
p=45	4 ± 1	0,35	7,62.10 ⁻²	56,5	93,5
p=50	4 ± 2	0,38	-	-	-
p=66	4 ± 1	0,35	-	-	-

FIGURE 8

Composés A	p=5	p=8	p=11
$Tm_{granulo}$	42,4 ± 0,5 °C	41 ± 1 °C	44 ± 1 °C
Tm_{fluo}	42 ± 1 °C	41	46 ± 1 °C

FIGURE 9

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/FR2004/002667

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C07C323/60 A61K9/127 A61K31/221 A61K7/48

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C07C A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the International search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, CHEM ABS Data, BEILSTEIN Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	ITOH F ET AL: "Synthesis and structure-activity relationships of TAN-1511 analogues as potent haematopoietic agents" CHEMICAL AND PHARMACEUTICAL BULLETIN, PHARMACEUTICAL SOCIETY OF JAPAN. TOKYO, JP, vol. 46, no. 2, February 1998 (1998-02), pages 255-273, XP002310944 ISSN: 0009-2363	1,2,13, 17
A	page 255; figure 1; example 3 page 256; figure 2 page 257; examples 10-12 page 258; examples 26,29,30 page 261; examples 12a-12d; table 1 page 261; examples 30a-30b; table 2 ----- -/-	3,14

Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in annex.

° Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the International filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the International filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the International filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the International search

11 April 2005

Date of mailing of the International search report

21/04/2005

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Bedel, C

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/FR2004/002667

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DATABASE BEILSTEIN BEILSTEIN INSTITUTE FOR ORGANIC CHEMISTRY, FRANKFURT-MAIN, DE; 1996, HIDA TSUNAEKI: XP002324041 Database accession no. 7327636 abstract & HIDA TSUNAEKI: J.ANTIBIOT., vol. 48, no. 7, 1995, pages 589-603, -----	1,2,13, 17
X	KURIMURA M ET AL: "SYNTHESIS OF BIOLOGICALLY ACTIVE PENTAPEPTIDE ANALOGS OF THE N-TERMINAL PART OF LIPOPROTEIN FROM THE OUTER MEMBRANE OF ESCHERICHIA COLI" CHEMICAL AND PHARMACEUTICAL BULLETIN, PHARMACEUTICAL SOCIETY OF JAPAN. TOKYO, JP, vol. 38, no. 4, 1990, pages 1110-1112, XP001148881 ISSN: 0009-2363 page 1111; example 14 -----	1,2,13, 17
X	KURIMURA M ET AL: "SYNTHESIS AND MITOGENIC ACTIVITY OF CHIRAL LIPOPEPTIDE WS1279 AND ITS DERIVATIVES" CHEMICAL AND PHARMACEUTICAL BULLETIN, PHARMACEUTICAL SOCIETY OF JAPAN. TOKYO, JP, vol. 41, no. 11, November 1993 (1993-11), pages 1965-1970, XP001148870 ISSN: 0009-2363 page 1966; figure 2; examples 7-11 -----	1,2,13, 17
X	KURIMURA M ET AL: "SYNTHESIS OF OPTICALLY ACTIVE LIPOPEPTIDE ANALOGS FROM THE OUTER MEMBRANE OF ESCHERICHIA COLI" CHEMICAL AND PHARMACEUTICAL BULLETIN, PHARMACEUTICAL SOCIETY OF JAPAN. TOKYO, JP, vol. 39, no. 10, 1991, pages 2590-2596, XP001148871 ISSN: 0009-2363 page 2592; example 32 page 2593; examples 9,10,40 -----	1,2,13, 17
A	US 2003/017976 A1 (FIDLER ISAIAH ET AL) 23 January 2003 (2003-01-23) claims; figures 1,2 -----	1-22
A	US 6 458 381 B1 (JUNG GUENTHER ET AL) 1 October 2002 (2002-10-01) claims 1,2,29 -----	1-22
A	US 5 206 027 A (KITAGUCHI ET AL) 27 April 1993 (1993-04-27). column 3; examples 4,6,8; tables -----	1-22

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR2004/002667

Patent document cited in search report		Publication date		Patent family member(s)		Publication date
US 2003017976	A1	23-01-2003	US	2004146552 A1		29-07-2004
			AU	2214199 A		26-07-1999
			WO	9935162 A1		15-07-1999
US 6458381	B1	01-10-2002	DE	19605175 A1		14-08-1997
			AT	223374 T		15-09-2002
			AU	713039 B2		18-11-1999
			AU	1724097 A		02-09-1997
			CA	2246456 A1		21-08-1997
			DE	59708130 D1		10-10-2002
			DK	883602 T3		06-01-2003
			WO	9730024 A2		21-08-1997
			EP	0883602 A2		16-12-1998
			ES	2183133 T3		16-03-2003
			JP	3525393 B2		10-05-2004
			JP	11506795 T		15-06-1999
			PT	883602 T		31-01-2003
US 5206027	A	27-04-1993	JP	2601373 B2		16-04-1997
			JP	4124166 A		24-04-1992

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale No

PCT/FR2004/002667

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE

CIB 7 C07C323/60 A61K9/127 A61K31/221 A61K7/48

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 7 C07C A61K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, CHEM ABS Data, BEILSTEIN Data

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	ITOH F ET AL: "Synthesis and structure-activity relationships of TAN-1511 analogues as potent haematopoietic agents" CHEMICAL AND PHARMACEUTICAL BULLETIN, PHARMACEUTICAL SOCIETY OF JAPAN. TOKYO, JP, vol. 46, no. 2, février 1998 (1998-02), pages 255-273, XP002310944 ISSN: 0009-2363	1, 2, 13, 17
A	page 255; figure 1; exemple 3 page 256; figure 2 page 257; exemples 10-12 page 258; exemples 26, 29, 30 page 261; exemples 12a-12d; tableau 1 page 261; exemples 30a-30b; tableau 2 ----- -/-	3, 14

Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

- *A* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- *E* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- *L* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- *O* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- *P* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- *T* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- *X* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- *Y* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- *&* document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

11 avril 2005

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

21/04/2005

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Bedel, C

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No

PCT/FR2004/002667

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'Indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	DATABASE BEILSTEIN BEILSTEIN INSTITUTE FOR ORGANIC CHEMISTRY, FRANKFURT-MAIN, DE; 1996, HIDA TSUNAEKI: XP002324041 Database accession no. 7327636 abrégé & HIDA TSUNAEKI: J.ANTIBIOT., vol. 48, no. 7, 1995, pages 589-603, _____	1,2,13, 17
X	KURIMURA M ET AL: "SYNTHESIS OF BIOLOGICALLY ACTIVE PENTAPEPTIDE ANALOGS OF THE N-TERMINAL PART OF LIPOPROTEIN FROM THE OUTER MEMBRANE OF ESCHERICHIA COLI" CHEMICAL AND PHARMACEUTICAL BULLETIN, PHARMACEUTICAL SOCIETY OF JAPAN. TOKYO, JP, vol. 38, no. 4, 1990, pages 1110-1112, XP001148881 ISSN: 0009-2363 page 1111; exemple 14 _____	1,2,13, 17
X	KURIMURA M ET AL: "SYNTHESIS AND MITOGENIC ACTIVITY OF CHIRAL LIPOPEPTIDE WS1279 AND ITS DERIVATIVES" CHEMICAL AND PHARMACEUTICAL BULLETIN, PHARMACEUTICAL SOCIETY OF JAPAN. TOKYO, JP, vol. 41, no. 11, novembre 1993 (1993-11), pages 1965-1970, XP001148870 ISSN: 0009-2363 page 1966; figure 2; exemples 7-11 _____	1,2,13, 17
X	KURIMURA M ET AL: "SYNTHESIS OF OPTICALLY ACTIVE LIPOPEPTIDE ANALOGS FROM THE OUTER MEMBRANE OF ESCHERICHIA COLI" CHEMICAL AND PHARMACEUTICAL BULLETIN, PHARMACEUTICAL SOCIETY OF JAPAN. TOKYO, JP, vol. 39, no. 10, 1991, pages 2590-2596, XP001148871 ISSN: 0009-2363 page 2592; exemple 32 page 2593; exemples 9,10,40 _____	1,2,13, 17
A	US 2003/017976 A1 (FIDLER ISAIAH ET AL) 23 janvier 2003 (2003-01-23) revendications; figures 1,2 _____	1-22
A	US 6 458 381 B1 (JUNG GUENTHER ET AL) 1 octobre 2002 (2002-10-01) revendications 1,2,29 _____	1-22
A	US 5 206 027 A (KITAGUCHI ET AL) 27 avril 1993 (1993-04-27) colonne 3; exemples 4,6,8; tableaux _____	1-22

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande Internationale No

PCT/FR2004/002667

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)			Date de publication
US 2003017976	A1	23-01-2003	US	2004146552 A1	29-07-2004
			AU	2214199 A	26-07-1999
			WO	9935162 A1	15-07-1999
US 6458381	B1	01-10-2002	DE	19605175 A1	14-08-1997
			AT	223374 T	15-09-2002
			AU	713039 B2	18-11-1999
			AU	1724097 A	02-09-1997
			CA	2246456 A1	21-08-1997
			DE	59708130 D1	10-10-2002
			DK	883602 T3	06-01-2003
			WO	9730024 A2	21-08-1997
			EP	0883602 A2	16-12-1998
			ES	2183133 T3	16-03-2003
			JP	3525393 B2	10-05-2004
			JP	11506795 T	15-06-1999
			PT	883602 T	31-01-2003
US 5206027	A	27-04-1993	JP	2601373 B2	16-04-1997
			JP	4124166 A	24-04-1992